

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CAROLINA PELLOSI

**AÇÃO DO PRECURSOR DA MELANINA, O ÁCIDO 5,6-DIHIDROXI-INDOL-2-CARBOXÍLICO, NO DANO À 2'-DESOXIGUANOSINA E AO DNA PLASMIDIAL NA PRESENÇA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

CURITIBA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CAROLINA PELLOSI

**AÇÃO DO PRECURSOR DA MELANINA, O ÁCIDO 5,6-DIHIDROXI-INDOL-2-CARBOXÍLICO, NO DANO À 2'-DESOXIGUANOSINA E AO DNA PLASMIDIAL NA PRESENÇA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências - Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção de título de mestre em Ciências - Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Glaucia Regina Martinez.

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Pellosi, Maria Carolina

Ação do precursor da melanina, o ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico, no dano à 2'-desoxiguanosina e ao DNA plasmidial na presença de espécies reativas de oxigênio. / Maria Carolina Pellosi. – Curitiba, 2013.

85f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Glaucia Regina Martinez

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. DNA . 2. Polímeros . 3. Melanina. I. Título II. Martinez, Glaucia Regina. III Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA CAROLINA PELLOSI

**Ação do precursor de melanina, o ácido 5,6-dihidróxi-indol-2-carboxílico (DHICA) no dano à 2'-desoxiguanosina e ao DNA plasmidial na presença de espécies reativas de oxigênio**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências - Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Prof. Dra. Gláucia Regina Martinez

Orientador – Departamento de Bioquímica, UFPR.



Prof. Dr. Rubens Bertazzoli Filho

Departamento de Biologia Celular, UFPR.



Prof. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer

Departamento de Bioquímica, UFPR.

Curitiba, 22 de fevereiro de 2013.

*A Deus e aos meus pais, João  
Fernando Pellosi e Francisca R.  
Pellosi, por serem minha fortaleza  
e me ensinarem o caminho certo a  
seguir.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que sempre esteve à frente nas minhas decisões.

À pós-graduação em Ciências - Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade. À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dra. Glaucia Regina Martinez, pela brilhante orientação. A todas as professoras do Grupo de Oxidações Biológicas, pelo apoio e contribuição e a todos os professores do Depto de Bioquímica.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Paolo Di Mascio, da Universidade de São Paulo e sua aluna Alexsandra Scalfo pela síntese do DHPN. À Prof<sup>a</sup> Daniela de Luna Martins, da Universidade Federal Fluminense, pela síntese do DHICA. À Prof<sup>a</sup> Nadja C. S. P. Lardner, também da Universidade de São Paulo e sua aluna Carolina Parga, por cederem seu tempo e os reagentes necessários para a realização dos ensaios de inibição enzimática. Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio pela utilização de alguns equipamentos.

À minha família, meus pais João Fernando Pellosi e Francisca Rocha Pellosi, e minhas irmãs, Maria Tereza e Maria Raquel Pellosi, pelo excelente exemplo de força e humildade, por todo apoio, moral e financeiro e por todo carinho que tanto precisei para que eu chegasse até aqui.

A todos os colegas de laboratório, que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho. Em especial à Andréia Akemi Suzukawa, por todo ensinamento, ajuda, ideias e participação efetiva na realização deste trabalho. À Patrícia da Silva Peres, pelo auxílio incondicional dentro e fora do laboratório, por toda motivação, momentos de seriedade e principalmente pelas crises de riso, que tanto me fizeram bem durante o decorrer desses dois anos.

A todos os colegas da turma de mestrado 2011, em especial à Lyvia L. Petiz, por toda amizade e companheirismo, pelas palavras de força nas horas difíceis e pelas piadas nos momentos de descontração. Aos amigos, Monique M. Cunha, Juliana de C. N. Kenski, e Leandro F. Moreno, pela parceria, risadas e alegrias proporcionadas.

As amigas, Nessana Dartora e Elizangela Rozanski, por representarem tão bem o papel de família e por tornarem minha vivência em Curitiba muito mais agradável.

As agências financiadoras, CNPq, CAPES, Fundação Araucária, CT-Infra FINEP and INCT de Processos Redox em Biomedicina – Redoxoma.

*Assim diz o Senhor: Irei eu caminhando à tua frente.*

*(Isaías 45, 2)*

## RESUMO

Eumelanina é um polímero heterogêneo composto por unidades monoméricas de três catecóis indólicos. O ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA), o dihidroxi-indol (DHI) e a dopaquinona, sendo o primeiro o mais abundante. Esses intermediários melanogênicos podem escapar da síntese de eumelanina, nos melanossomos e serem encontrados na urina, podendo ser utilizados como marcadores bioquímicos da função normal e patológica dos melanócitos. Nos últimos anos, tem-se descoberto novos papéis para a melanina da pele e os seus precursores. Foi verificado que o DHICA, pode provocar quebra de fita simples em DNA plasmidial, quando sob radiação ultravioleta B (UVB, 313 nm) e em DNA de células de queratinócitos humanos, quando sob radiação ultravioleta A (UVA, 340-400 nm). Interessantemente, radiação ultravioleta (UV) promove o aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) no ambiente celular, sendo o oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ), uma das espécies formadas, principalmente sob ação da radiação UVA. Por sua vez, ROS estão diretamente envolvidas no mecanismo de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e também na carcinogênese. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do precursor de eumelanina, DHICA, no dano ao DNA plasmidial pela ação do  $^1\text{O}_2$ . A fim de verificar a influência deste precursor na atividade da enzima Fpg, realizou-se a pré-oxidação do plasmídeo com  $^1\text{O}_2$  e avaliou-se a capacidade da enzima de reconhecer os sítios lesionados na presença e ausência de DHICA. Além disso, foi utilizado o nucleosídeo livre, 2'-desoxiguanosina (dGuo) para avaliar se o precursor poderia interferir na formação dos principais produtos de oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$  e  $\cdot\text{OH}$ , que são a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e espiroimidantoína (dSp) para o  $^1\text{O}_2$  e 8-oxodGuo e formamidopirimidina-2'-desoxiguanosina (Fapy-dG) para o  $\cdot\text{OH}$ . Foi observado que o DHICA sozinho pode provocar danos ao DNA plasmidial, promovendo o aumento de quebra de fita simples do mesmo em cerca de 4 vezes e, quando pré-oxidado pelo  $^1\text{O}_2$ , o precursor perde essa capacidade nociva. Verificou-se também que o DHICA pode interagir com o DNA, o que afetou a ação da enzima Fpg, diminuindo cerca de 50% sua capacidade de reconhecimento de lesões. Quanto aos resultados obtidos com a dGuo, verificou-se que o DHICA interfere na formação dos produtos de oxidação da mesma. Quando a dGuo é oxidada pelo  $^1\text{O}_2$  na presença de DHICA, ocorre acúmulo de 8-oxodGuo, onde sua concentração é cerca de 4 vezes maior do que na ausência do precursor, o que mostra que o DHICA estaria provavelmente impedindo a re-oxidação da 8-oxoG à dSp. Já quando a dGuo é oxidada pelo  $\cdot\text{OH}$  na presença do DHICA, o resultado é o inverso. Na presença do precursor, a concentração de 8-oxodGuo formada foi cerca de 1,5 vezes menor do que na sua ausência. Esses dados sugerem que o DHICA possa estar promovendo o deslocamento da reação para formação de Fapy-dG ou inibindo a formação do  $\cdot\text{OH}$  pela reação de Fenton. De modo geral, os dados obtidos permitem evidenciar o papel importante desse precursor da melanina em relação aos danos no DNA e sua implicação sobre o sistema de reparo.

Palavras-chave: Eumelanina. DNA. Espécies reativas de oxigênio.



## ABSTRACT

Eumelanin is an heterogeneous polymer composed of monomer units of three catecholic indoles, the 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA), the 5,6-dihydroxyindole (DHI) and dopaquinone. These melanogenic intermediates may escape from the eumelanin synthesis within the melanosome and, as they can be found in urine, they can be used as biochemical markers of both normal and pathological melanocyte function. In recent years, new roles for skin melanin and its precursors have been discovered. DHICA was found to promote single strand breaks in plasmid DNA under ultraviolet B radiation (UVB, 313 nm) and in DNA from cells of human keratinocytes under ultraviolet A radiation (UVA, 340-400 nm). Interestingly, ultraviolet (UV) radiation promotes the increase in the levels of reactive oxygen species (ROS) in the cellular environment, and singlet molecular oxygen ( $^1\text{O}_2$ ) is formed mainly by action of UVA radiation. Moreover, ROS are directly involved in the mechanism of development of neurodegenerative diseases and also in carcinogenesis. In this context, the aim of this study was to evaluate the role of eumelanin precursor, DHICA, in plasmid DNA damage by  $^1\text{O}_2$ . In order to check the influence of this precursor in the Fpg activity, plasmid DNA was pre-oxidized with  $^1\text{O}_2$  and the ability of the enzyme to recognize the injured site in the presence and absence of DHICA was evaluated. Furthermore, the nucleoside free deoxyguanosine (dGuo) was used to evaluate if the precursor would interfere in the formation of the major oxidation products of dGuo by  $^1\text{O}_2$  and  $\bullet\text{OH}$ , which are the 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine (8-oxodGuo) and spiroiminodihydantoin (dSp) for the  $^1\text{O}_2$  and 8-oxodGuo and formamidopirimidinideoxyguanosine (Fapy-dG) for the  $\bullet\text{OH}$ . We observed that DHICA itself can cause damage to the plasmid DNA, increasing single strand breaks about 4 times in relation to control. When DHICA was pre-oxidized by  $^1\text{O}_2$ , the precursor loses this harmful capacity. It was also found that DHICA may interact with DNA which disturbed Fpg action, decreasing by ~ 50% its capacity of lesion recognition. In relation to the results obtained with dGuo, it was found that DHICA interferes with the formation of the oxidation products. When dGuo is oxidized by  $^1\text{O}_2$  in the presence of DHICA, there is an accumulation of 8-oxodGuo, about 4 times greater than in the absence of the precursor, which shows that the DHICA could probably prevent the re-oxidation of 8-oxodGuo dSp. Conversely, when the dGuo is oxidized by  $\bullet\text{OH}$  in the presence of DHICA, the result is opposite. In the precursor presence, the concentration of 8-oxodGuo formed was about 1.5 times lesser than in its absence. These data suggest that DHICA could promote a shift in the reaction towards the formation of Fapy-dG or an inhibition of  $\bullet\text{OH}$  formation by Fenton reaction. In general, our data allow to show an important role for this melanin precursor in relation to DNA damage and its implication over the repair system.

Key-words: Eumelanin. DNA. Singlet oxygen.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - TRANSVERSÃO DE UM PAR G:C PARA UM PAR T:A DEVIDO À OXIDAÇÃO DA GUANINA EM 8-OXOG.....	24
FIGURA 2 - MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DA dGUO PELO $^1\text{O}_2$ .....	25
FIGURA 3 - FORMAÇÃO DE FAPY-dG E 8-OXOdGUO A PARTIR DE UM INTERMEDIÁRIO COMUM.....	27
FIGURA 4 - PAREAMENTO INCORRETO NO DNA PROVOCADO POR LESÕES DO TIPO FAPY-dG.....	28
FIGURA 5 - MECANISMO DE AÇÃO DAS ENZIMAS OGG1 E MYH.....	30
FIGURA 6 – ESTRUTURA MOLECULAR DOS MONÔMEROS COMPONENTES DO POLÍMERO EUMELANINA.....	32
FIGURA 7 - REAÇÃO DE DECOMPOSIÇÃO DO ENDOPERÓXIDO DHPNO <sub>2</sub> À 37°C.....	38
FIGURA 8 - AS TRÊS FORMAS TOPOLÓGICAS DO DNA PLASMIDIAL E SUAS DIFERENÇAS NA CORRIDA ELETROFORÉTICA.....	44
FIGURA 9 - DIFERENÇA DE VELOCIDADE DE CORRIDA DE OLIGO ÍNTEGRO E CLIVADO POR FPG NUM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	50
FIGURA 10 – INCUBAÇÃO DO DNA COM DHICA, DHPNO <sub>2</sub> E DHPN.....	54
FIGURA 11 - PRÉ-OXIDAÇÃO DO DHICA PELO DHPNO <sub>2</sub> .....	55
FIGURA 12 - DNA PRÉ-OXIDADO COM DHPNO <sub>2</sub> E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM AS ENZIMAS FPG E ENDO III, COM E SEM DHICA.....	56
FIGURA 13 - DIMINUIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DO SISTEMA EtBr-DNA PROMOVIDA PELO DHICA.....	58
FIGURA 14 - DIMINUIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DO SISTEMA EtBr-DNA PROMOVIDA PELO DHICA PRÉ-OXIDADO PELO DHPNO <sub>2</sub> .....	59
FIGURA 15 - EXPERIMENTO CONTROLE – DNA INCUBADO COM E SEM RB, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LUZ.....	61
FIGURA 16 - ADIÇÃO DE DNA COMPETIDOR AO CONTROLE NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DHICA.....	62
FIGURA 17 - ADIÇÃO DE DNA COMPETIDOR AO DNA PREVIAMENTE OXIDADO NA PRESENÇA DE DHICA.....	63
FIGURA 18 - INCUBAÇÃO DO OLIGO COM DHICA E FPG.....	66
FIGURA 19 - INFLUÊNCIA DO DHICA NA FORMAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA dGUO PELO $^1\text{O}_2$ .....	68

FIGURA 20 - INFLUÊNCIA DO DHICA NA FORMAÇÃO DE 8-OXOdGUO PELO $\bullet$ OH.....	70
FIGURA 21 - PRODUTOS DE OXIDAÇÃO GERADOS ATRAVÉS DA REAÇÃO DA GUANINA COM $\bullet$ OH.....	72

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NOS ORBITAIS MOLECULARES ( $\pi^*$ ) DO OXIGÊNIO NO ESTADO EXCITADO SINGLETE ( $^1\Sigma_g^+$ , $^1\Delta_g$ ) E NO ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETE ( $^3\Sigma_g^-$ ).....	19
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO (mM) DAS SOLUÇÕES DE DILUIÇÃO 1:100 DAS ENZIMAS FPG E ENDO III.....	42
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO (mM) DOS TAMPÕES RESPECTIVOS PARA AS ENZIMAS FPG E ENDO III.....	42

## LISTA DE SIGLAS

8-oxoG – 8-oxo-7,8-dihidroguanina

8-oxodGuo – 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina

ACN - acetonitrila

AP – apurínico ou apirimidínico

APS – persulfato de amônio

ATP – adenosina trifosfato

BER – reparo por excisão de bases

BSA – albumina de soro bovino

dGuo – 2'-desoxiguanosina

DHI – dihidroxi-indol

DHICA – ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico

DHPN - *N,N'*-di-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida

DHPNO<sub>2</sub> – endoperóxido de *N,N'*-di-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida

DO – densidade óptica

DNA – ácido desoxirribonucleico

dSp – diastereoisômeros espiroiminodihidantoína desoxirribose

DTT – ditionitrito

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

Endo III – endonuclease III

EPR – espectroscopia de ressonância magnética

ESIPT – transferência de prótons intramolecular no estado excitado

EtBr – brometo de etídeo

Fapy-G – formamidopirimidinaguanina

Fapy-dG- formamidopirimidina-2'-desoxiguanosina

Fpg – formamidopirimidina-DNA-glicosilase

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

LED – diodos emissores de luz

MeOH - metanol

MPP(+) - 1-metil-4-fenilpiridina

MYH – A/G - adenina DNA glicosilase específica

NAD<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NER – reparo por excisão de nucleotídeos

NTH 1 – timina-glicol-DNA-glicosilase

OGG1 – 8-hidroxiguanina DNA-glicosilase

Oligo – oligonucleotídeo

pH – potencial hidrogeniônico

PPAR – “*Peroxisome proliferators-activated receptors*”

RB – Rosa Bengala

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio

SOD – superóxido dismutase

TMED – tetrametiletilenodiamina

UV – ultravioleta

UVA – ultravioleta A

UVB – ultravioleta B

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) .....	18
2.1.1 Oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ).....	19
2.1.2 Ânion Superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ).....	20
2.1.3 Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) .....	21
2.1.4 Radical hidroxila ( $^{\bullet}\text{OH}$ ) .....	22
2.2 DANOS AO DNA CAUSADOS POR ROS .....	23
2.2.1 Danos ao DNA causados por $^1\text{O}_2$ .....	24
2.2.2 Danos ao DNA causados pelo $^{\bullet}\text{OH}$ .....	26
2.2.3 Reparo do DNA .....	28
2.3 EUMELANINA E SEU PRECURSOR, O ÁCIDO 5,6-DIHIDROXI-INDÓLICO (DHICA).....	31
3. OBJETIVOS .....	36
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
4.1 REAGENTES .....	37
4.2 SISTEMAS GERADORES DE $^1\text{O}_2$ .....	37
4.2.1 Endoperóxido da N,N'-di-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) propanamida (DHPNO <sub>2</sub> ).....	37
4.2.2 Fotossensibilização .....	38
4.3 ENSAIOS COM DNA PLASMIDIAL .....	39
4.3.1 Extração do DNA plasmidial.....	39
4.3.2 Incubação do DNA com DHICA .....	40
4.3.3 Incubação do DNA com DHICA na presença de $^1\text{O}_2$ .....	40
4.3.4 Incubação com as enzimas de reparo Fpg e Endo III .....	41
4.3.5 Eletroforese em gel de agarose .....	42
4.4 INTERAÇÃO DO DHICA COM O DNA .....	45
4.4.1 Adição de DHICA ao conjunto EtBr - DNA .....	45
4.4.2 Adição de DHICA pré-oxidado ao conjunto EtBr - DNA .....	45
4.5 INFLUÊNCIA DO DHICA NA ATIVIDADE DA ENZIMA FPG .....	46
4.5.1 Preparo do DNA oxidado.....	46

4.5.2 Incubação do DNA oxidado com Fpg na presença de DHICA .....	46
4.5.3 Ensaio de competição .....	47
4.6 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA FPG .....	48
4.6.1 Obtenção do oligonucleotideo .....	48
4.6.2 Ensaio de pré-incubação.....	49
4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	49
4.7 ENSAIOS COM 2'-DESOXIGUANOSINA .....	50
4.7.1 Incubação da dGuo com DHICA e ROS.....	50
4.7.2 Síntese de dSp.....	51
4.7.3 Detecção de 8-oxodGuo.....	51
4.7.4 Detecção de dSp.....	52
5. RESULTADOS .....	53
5.1 ENSAIOS COM DNA PLASMIDIAL .....	53
5.1.1 Incubação do DNA com DHICA e $^1\text{O}_2$ .....	53
5.1.2 Interação do DHICA com o DNA .....	57
5.1.3 Ensaio de Competição .....	60
5.2 ENSAIOS DE INIBIÇÃO.....	65
5.3 ENSAIOS COM 2'-DESOXIGUANOSINA .....	67
5.3.1 Efeito do DHICA nos produtos de oxidação da dGuo por $^1\text{O}_2$ .....	67
5.3.2 Efeito do DHICA nos produtos de oxidação da dGuo por $\bullet\text{OH}$ .....	69
6. DISCUSSÃO .....	73
7. CONCLUSÕES .....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78



## 1. INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta (UV) pode levar a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em células de queratinócitos humanos, foi evidenciada presença de oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ ) quando as mesmas foram expostas à radiação UVA (BAIER *et al.*, 2007). Utilizando-se a mesma linhagem celular, verificou-se aparecimento de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), quando as células foram expostas à radiação UVA e UVB (AITKEN *et al.*, 2007).

O dano ao DNA é de particular importância, visto o papel central desta biomolécula no armazenamento em sua estrutura de toda a informação que direciona a síntese dos outros constituintes celulares e que, por sua vez, formarão o indivíduo como um todo. Sendo assim, lesões no DNA podem ocasionar mutações que poderão ser refletidas em todo o organismo. Considerando as graves consequências desse processo os organismos apresentam eficientes sistemas de proteção, como as vias de reparo de dano ao DNA. Estudar os mecanismos que levam à formação dessas lesões e as formas como estas podem contribuir para o aparecimento de muitas doenças, como câncer e doenças neurodegenerativas, é um grande desafio a ser considerado.

Por sua vez, compostos que previnam o surgimento de lesões em biomoléculas são outra forma de manter a integridade do material genético. A eumelanina é um pigmento produzido nos melanócitos da pele. É um polímero heterogêneo, composto de unidades monoméricas de catecóis indólicos, como o ácido 5,6-dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA), o 5,6-dihidroxi-indol (DHI) e a dopaquinona (PROTA, 1980). Durante muitos anos, acreditava-se que a principal função da melanina da pele era a de bloquear a passagem de radiação solar e assim proteger esse tecido das injúrias causadas pelo excesso de exposição à luz do sol. Porém, muitos estudos têm mostrado um relevante potencial citotóxico desse pigmento e seus precursores. Estes intermediários melanogênicos podem escapar da síntese de eumelanina, podendo ser encontrados na urina e são utilizados como marcadores bioquímicos da função normal e patológica dos melanócitos (HANSSON, 1983). Routaboul e colaboradores (1995) comprovaram que o DHICA, na presença de radiação ultravioleta B (UVB), induz o aparecimento de quebra em DNA plasmidial. Em 1999, Kipp e Young, verificaram que células de queratinócitos

humanos incubadas com DHICA e irradiadas com luz ultravioleta A (UVA) apresentaram quebra de fitas simples no DNA (ácido desoxirribonucleico).

Dessa forma, este trabalho teve como foco principal elucidar o papel do DHICA e o envolvimento das ROS na geração de danos ao DNA e as consequências para o sistema de reparo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

Radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio são produzidas em uma grande variedade de processos fisiológicos. Elas são capazes de infligir danos a biomoléculas e, são as principais responsáveis pelo envelhecimento. As ROS também estão relacionadas com a patologia de muitas doenças como, câncer, doenças neurodegenerativas e, processos inflamatórios (WINTERBOURN, 2008). O termo ROS não é aplicado somente aos radicais de oxigênio, como os radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ),  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{NO}^\bullet$ , os derivados não radicalares também estão inclusos, como por exemplo, ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e  $^1\text{O}_2$  (BERRA *et al.*, 2006).

O DNA e as células do corpo humano estão constantemente susceptíveis ao ataque de espécies oxidantes, que podem ser de fontes tanto exógenas como endógenas. Fontes exógenas de oxidação derivam da exposição do indivíduo à radiação ionizante, oxidantes químicos ou radiação solar (KRYSTON *et al.*, 2011). ROS também podem ser formadas a partir do contato com asbestos, sílica cristalina, íons metálicos, agentes quimioterápicos e quimiopreventivos, cigarro, pesticidas e compostos neurotóxicos como o 1-metil-4-fenilpiridina [MPP(+)] (SVILAR *et al.*, 2011). As fontes endógenas correspondem às originadas intracelularmente, decorrentes da sinalização celular, processos metabólicos ou durante um processo inflamatório (KRYSTON *et al.*, 2011). Microsossomos, fagócitos e algumas enzimas citossólicas, tais como, NADPH oxidase, são também grandes produtores de ROS no organismo (SVILAR *et al.*, 2011). No ambiente intracelular elas também são produzidas a partir do metabolismo oxidativo. Cerca de 1-5% de todo o  $\text{O}_2$  consumido para respiração são transformados em espécies reativas dentro da mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons. Esta é considerada a maior fonte de ROS nos organismos aeróbicos (KRYSTON *et al.*, 2011). Dependendo da extensão e, do tipo de exposição às ROS, todas as macromoléculas estão sujeitas a serem danificadas (SVILAR *et al.*, 2011).

### 2.1.1 Oxigênio molecular singlete ( $^1\text{O}_2$ )

O oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) é um radical livre e no estado fundamental contém dois elétrons desemparelhados localizados em diferentes orbitais  $\pi$  antiligantes. Esses elétrons possuem spins paralelos ( $\uparrow\uparrow$ ), o que caracteriza um estado tripleto ( $^3\Sigma_g^-$ ). Como mostrado na Tabela 1, um acréscimo de energia ao  $\text{O}_2$  no estado fundamental pode convertê-lo a dois estados excitados diferentes, na forma singlete. O primeiro estado excitado,  $^1\Delta_g$ , possui dois elétrons com spins opostos ( $\uparrow\downarrow$ ) ocupando o mesmo orbital  $\pi$ , tem energia de 22,5 kcal acima do estado fundamental e sua vida-média é alta, cerca de  $10^{-6}$  s em água. O segundo estado excitado, o  $^1\Sigma_g^+$ , tem um elétron em cada orbital  $\pi$  degenerado, com spins opostos e possui uma energia de 37,5 kcal. O tempo de meia vida do  $^1\Sigma_g^+$  é menor ( $10^{-11}$  s) e logo decai para o estado  $^1\Delta_g$ . Sendo assim, em sistemas biológicos, o estado singlete do oxigênio de maior importância é o do primeiro estado excitado e será denotado por  $^1\text{O}_2$  (RONSEIN *et al.*, 2006).

Estado	Orbitais $\pi^*$	Energia (kcal/mol)	Tempo de vida (s)
$^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \quad \downarrow$	37,5	$10^{-11}$
$^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow$	22,5	$10^{-6}$
$^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \quad \uparrow$		

**TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NOS ORBITAIS MOLECULARES ( $\pi^*$ ) DO OXIGÊNIO NO ESTADO EXCITADO SINGLETE ( $^1\Sigma_g^+$ ,  $^1\Delta_g$ ) E NO ESTADO FUNDAMENTAL TRIPLETO ( $^3\Sigma_g^-$ )**

FONTE: Rosein e colaboradores (2006).

A regra de restrição de spin não permite que o  $\text{O}_2$  no estado fundamental possa receber diretamente um par de elétrons com spins antiparalelos, portanto, mesmo sendo um radical, essa característica o torna praticamente inerte. Por outro lado, o  $^1\text{O}_2$  não tem sua reatividade limitada pela regra de restrição de spin, ele possui um orbital  $\pi$  vazio, conferindo-lhe uma grande eletrofilicidade, facilitando sua

reação com moléculas que possuem alta densidade eletrônica. Em organismos vivos, as proteínas, lipídeos e o DNA são moléculas ricas em elétrons e, são portanto, os principais alvos do  $^1\text{O}_2$  (MARTINEZ *et al.*, 1999).

Em meios biológicos, o  $^1\text{O}_2$  pode ser formado de inúmeras maneiras, tais como, reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\bullet$ ), termodecomposição de dioxetanos ou através de enzimas, como as peroxidases e oxigenases (MARTINEZ *et al.*, 1999). Mecanismos de defesa contra vírus e bactérias por células responsáveis pela fagocitose também estão relacionados com geração de  $^1\text{O}_2$  *in vivo* (STEINBECK *et al.*, 1993).

O  $^1\text{O}_2$  pode reagir com as biomoléculas de duas diferentes maneiras, podendo ser através de reações químicas ou, por meio da transferência da sua energia de excitação, retornando ao seu estado fundamental. Algumas moléculas antioxidantes são responsáveis por receber essa energia e este processo é denominado como supressão física do  $^1\text{O}_2$ , tais moléculas podem ser carotenóides, bilirrubina, tocoferóis, fenóis e azida (RONSEIN *et al.*, 2006).

### 2.1.2 Ânion Superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ )

O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é formado através da redução de um elétron do  $\text{O}_2$ . Acredita-se que de 1-2% de todo o oxigênio consumido seja transformado em  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . O transporte de elétrons ou fosforilação oxidativa é localizado na membrana mitocondrial interna e, esta é considerada a maior fonte endógena deste radical. O oxigênio é inicialmente convertido a  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pelo vazamento de elétrons do complexo I e, do complexo III principalmente. O complexo III gera  $\text{O}_2^{\bullet-}$  através da auto-oxidação da ubisemiquinona, formada durante o ciclo Q. Já o mecanismo de geração deste ânion pelo complexo I ainda não é bem entendido, mas muitos estudos revelam que ocorre através do fluxo reverso de elétrons, do ubiquinol para o  $\text{NAD}^+$  (ISHIIL *et al.*, 2011).

O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é um radical que pode agir tanto como oxidante quanto como redutor, sendo que sua ação redutora é mais importante na biologia. O  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é capaz de reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  ligado a citrato, citocromo C, ferritina e enzimas contendo centros Fe-S, que podem então, perder a sua função. A taxa de reação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  com lipídios, proteínas e DNA é baixa o suficiente para ser considerada irrelevante (HERMES-

LIMA, 2004). Além disso, o  $O_2^{\bullet-}$  é rapidamente convertido em  $H_2O_2$ , espontaneamente ou através da enzima SOD e, no compartimento celular, as duas espécies sempre coexistem. Na matriz mitocondrial, a razão entre  $H_2O_2$  e  $O_2^{\bullet-}$  é em torno de 100:1 e, em torno de 1000:1 no citosol (LI *et al.*, 2012).

### 2.1.3 Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

O  $H_2O_2$  é uma espécie reativa de oxigênio não radicalar, formado através da redução de um eletrón do  $O_2^{\bullet-}$ . A reação de dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ , tanto espontaneamente quanto catalisada pela enzima SOD é a principal fonte de  $H_2O_2$  *in vivo* (HERMES-LIMA, 2004).  $H_2O_2$  é um metabólito celular normal, que é gerado continuamente e é mantido em baixas concentrações devido a ação de uma variedade de enzimas chamadas peroxidases, que decompõem o  $H_2O_2$  à água (JONES, 2008). Ele pode ser produzido em grandes quantidades por células fagocíticas durante processos inflamatórios (HAMPTON e ORRENIUS, 1997). Outras fontes de  $H_2O_2$  incluem enzimas distribuídas em compartimentos subcelulares, por exemplo, a família das enzimas xantina oxidase, oxidases do retículo endoplasmático, sulfidril oxidases, tiol oxidases e monoamina oxidases. Essas enzimas podem ser encontradas no citoplasma, na membrana, ou até mesmo no núcleo. Sendo assim, o  $H_2O_2$  está presente em todo o compartimento celular. No entanto, um aumento na sua concentração pode resultar no aparecimento de muitas doenças, como câncer e doenças neurodegenerativas e estresse do retículo endoplasmático (JONES, 2008).

O  $H_2O_2$  é um agente oxidante relativamente fraco, ele não pode, por exemplo, abstrair hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados (processo que inicia a peroxidação lipídica). O que o torna uma espécie potencialmente perigosa aos organismos vivos é a sua alta estabilidade e a sua capacidade de facilmente atravessar as membranas biológicas, devido a sua eletroneutralidade. Além disso, o  $H_2O_2$  pode interagir com metais de transição, principalmente  $Fe^{2+}$  e  $Cu^+$  e formar  $\bullet OH$  através da reação de Fenton (equação 1). A presença de radiação (energia) também pode converter o  $H_2O_2$  a  $\bullet OH$  (equação 2) (HERMES- LIMA, 2004).



#### 2.1.4 Radical hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ )

$\bullet\text{OH}$  é a mais potente das espécies reativas de oxigênio. Ele reage rapidamente com a maioria das biomoléculas danificando as células e o DNA (JUNG *et al.*, 2006). É largamente aceito que a reação de Fenton é a principal fonte de  $\bullet\text{OH}$  na biologia (HERMES-LIMA, 2004). A reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com íon  $\text{Fe}^{2+}$  aquoso é muito lenta ( $v = 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e, tem sua significância biológica limitada por muitos autores. No entanto, a ligação do  $\text{Fe}^{2+}$  a compostos de baixo peso molecular, como, adenosina trifosfato (ATP) ou citrato, aumenta a taxa de reação em duas ordens de magnitude. Por outro lado, a reação de Fenton com íons  $\text{Cu}^+$  ocorre com taxa de reação de  $5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Para a reação de Fenton continuar,  $\text{Fe}^{3+}$  deve ser convertido de volta em  $\text{Fe}^{2+}$  por agentes redutores, tais como  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , de acordo com a equação 3 (HERMES-LIMA, 2004). Sendo assim, a formação de  $\bullet\text{OH}$  por essa via, requer a presença de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e quantidades adequadas de ferro complexado (BECKMAN *et al.*, 1990).



Existem muitas outras fontes naturais de  $\bullet\text{OH}$  no meio biológico, dentre elas, homólise da água (equação 4) ou do  $\text{H}_2\text{O}_2$  (equação 2), ambas induzidas por radiações de alta energia, como radiação gama por exemplo, reação do HOCl com  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (equação 5) (HERMES-LIMA, 2004) e decomposição do ácido peroxinitroso (equação 6). Esta última reação ocorre, pois o  $\text{NO}^\bullet$  tem um elétron desemparelhado e, reage rapidamente com  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , formando o  $\text{ONOO}^\bullet$ . Em pH ácido este se torna protonado, gerando o ácido peroxinitroso, que por sua vez, se decompõe a  $\bullet\text{OH}$  e  $\text{NO}_2^\bullet$  (BECKMAN *et al.*, 1990).



Os  $\bullet\text{OH}$  estão envolvidos na iniciação da peroxidação lipídica em membranas biológicas e, também estão relacionados com dano a proteínas, DNA nuclear e mitocondrial. Carboidratos e ácido ribonucleico (RNA) são também alvos relevantes de  $\bullet\text{OH}$ . Esses radicais participam ainda na etiologia ou no agravamento de muitas doenças humanas, como câncer, doenças neurológicas e cardiovasculares, inflamações crônicas e, até mesmo, fadiga muscular em condições de intensa atividade física. O processo de envelhecimento natural causado por danos cumulativos em proteínas e DNA é também ocasionado principalmente devido a presença de  $\bullet\text{OH}$  no organismo (HERMES-LIMA, 2004; KANNO *et al.*, 2012).

## 2.2 DANOS AO DNA CAUSADOS POR ROS

A determinação do dano ao DNA foi parte dos primeiros estudos realizados sobre o efeito biológico dos radicais livres. Esses estudos tiveram início logo após a segunda guerra mundial, quando os pesquisadores se tornaram interessados em entender a base bioquímica da toxicidade da radiação ionizante. Em 1953, Rebeca Gerschman, da Universidade de Rochester na Argentina, comprovou que o dano provocado por radiação ionizante é devido à formação de radicais livres. Os resultados foram publicados um ano depois, na revista *Science*, em colaboração com Daniel L. Gilbert. Em seguida, eles relataram que alta pressão de oxigênio alterava a viscosidade de soluções de DNA. Em 1958, eles correlacionaram seus resultados obtidos *in vitro* com estudos sobre a mortalidade de ratos induzida sob altas concentrações de oxigênio. A idéia geral era que a redução univalente do oxigênio molecular, causada por radiação ionizante, era a principal causa da formação de intermediários reativos que poderiam danificar os componentes celulares, tais como o DNA (HERMES-LIMA, 2004).

A relação entre as ROS e o dano ao DNA envolve tipicamente o aparecimento de sítios abásicos (apurínicos e apirimidínicos), purinas e pirimidinas oxidadas e quebra de fita simples e dupla do DNA, além de ligações cruzadas entre DNA e

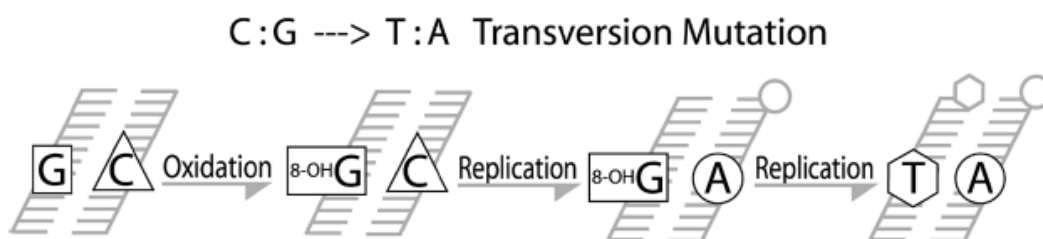


proteínas (KRYSTON *et al.*, 2011). As ROS também podem produzir anéis saturados de timina, hidroximetiluracila, fragmentos de timina e abertura do anel de adeninas (IMLAY e LINN, 1998).

### 2.2.1 Danos ao DNA causados por $^1\text{O}_2$

Muitos agentes químicos e físicos têm a habilidade de abstrair um elétron da guanina, que tem o mais baixo potencial de ionização dentre os componentes do DNA (CADET *et al.*, 2008). Esta base nitrogenada é alvo exclusivo de ataque do  $^1\text{O}_2$ , que tem como um dos produtos de oxidação a 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoG) (CADET *et al.*, 2006). Esta reação é específica, pois a guanina é a única que possui energia de orbital molecular que permite tal reação (BOITEUX *et al.*, 1992). A formação desse produto de oxidação ocorre por reação do tipo cicloadição de Diels-Alder (CADET *et al.*, 2006).

Guanina uma vez oxidada é capaz de parear com adenina e, um par, antes G-C, pode tornar-se um par T-A na próxima replicação do DNA. Como esquematizado na Figura 1, isso confere à simples oxidação desta base púrica, um potencial altamente mutagênico (BOITEUX *et al.*, 1992). Ademais, a 8-oxoG formada no *pool* de desoxinucleotídeos pode também ser inserida na nova fita de DNA pela DNA polimerase (SUZUKI *et al.*, 2007; SHIMIZU *et al.*, 2007).

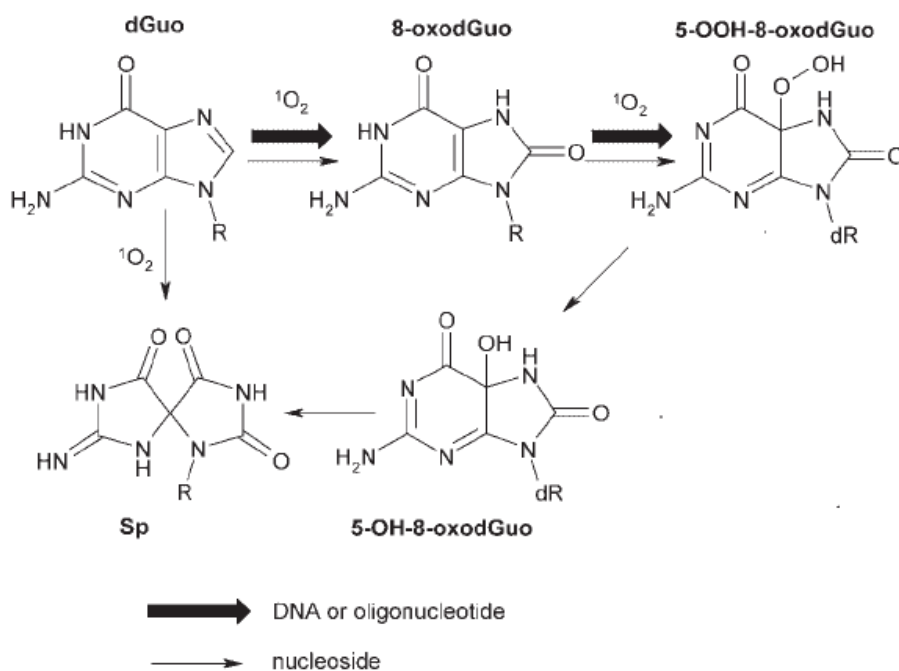


**FIGURA 1 - TRANSVERSÃO DE UM PAR G:C PARA UM PAR T:A DEVIDO À OXIDAÇÃO DA GUANINA EM 8-OXOG**

FONTE: Hermes-Lima (2004).

NOTA: A 8-oxoG uma vez formada através da oxidação da guanina, tem preferência por parear com uma adenina, ao invés de citosina. Se o dano não for reparado, na próxima replicação do DNA, a adenina irá parear com uma timina, tornando a mutação permanente.

Outros produtos de oxidação também podem ser gerados através da reação do  $^1\text{O}_2$  com a guanina, como o par de diastereoisômeros da espiroiminodihidantoína, denotada como dSp, que podem ser gerados cerca de 7 vezes mais do que a 8-oxoG (NILES *et al.*, 2001 e RAVANAT e CADET, 1995). Como ilustrado na Figura 2, a dSp pode ser gerada tanto pela oxidação direta da 2'-desoxiguanosina (dGuo) pelo  $^1\text{O}_2$ , quanto pela re-oxidação da 8-oxodGuo (8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina) anteriormente formada (MARTINEZ *et al.*, 2002). De fato, a 8-oxodGuo tem reatividade de aproximadamente 2 ordens de magnitude maior do que a sua precursora, dGuo (SHEU e FOOTE, 1995). Desta maneira, a preponderância de dSp mediada pela oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ , é considerada ser devido à oxidação secundária da 8-oxodGuo e não pelo simples fato da dGuo ter preferência em se oxidar a dSp (RAVANAT *et al.*, 2004, MARTINEZ *et al.* 2007).



**FIGURA 2 - MECANISMOS DE OXIDAÇÃO DA dGUO PELO  $^1\text{O}_2$**

FONTE: Adaptada de Martinez e colaboradores (2002).

NOTA: Produtos de oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ . A dSp pode ser formada tanto pela oxidação direta da dGuo, quanto pela re-oxidação da 8-oxodGuo.

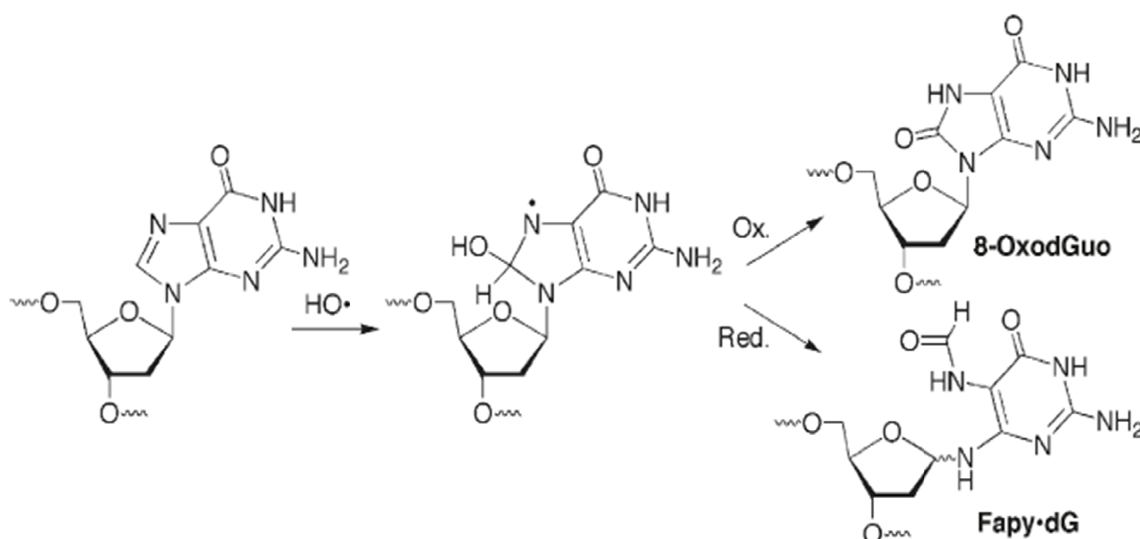
Até o momento não há relatos na literatura a respeito da capacidade da enzima DNA polimerase reconhecer essa lesão se formada no *pool* de

desoxinucleotídeos e inseri-la à nova fita de DNA. Porém, a dSp quando formada no DNA possui um maior caráter mutagênico com relação à 8-oxoG, como mostrado em ensaio de mutagênese em bactérias *E. coli*. Essa espécie gera quase 100% de mutação. Já sua precursora, 8-oxoG, por sua vez, gera apenas cerca de 3% de mutação (HENDERSON *et al.*, 2003). A dSp pareia principalmente com adeninas ou guaninas e somente uma pequena parte (1 a 2%) pareia corretamente com citosinas. Isso leva à uma transversão de um par de bases G-C, para um par de bases T-A ou C-G. Transversão do tipo G → T, é o segundo tipo mais comum de mutação em células somáticas de carcinomas humanos (COLE e SKOPEK, 1994). Ademais, essa mutação é frequentemente encontrada no gene supressor de tumor, p53 (HUSSAIN e HARRIS, 1999).

### 2.2.2 Danos ao DNA causados pelo $\bullet\text{OH}$

Diferentemente do  $^1\text{O}_2$ , que possui um alvo exclusivo de oxidação, o  $\bullet\text{OH}$  pode reagir tanto com as bases, quanto com os açúcares do DNA, não sendo a reação específica para nenhuma das espécies. Existem cinco principais classes de dano oxidativo ao DNA provocado por  $\bullet\text{OH}$ , incluindo bases oxidadas, sítios abásicos, adutos de DNA-DNA intracadeia e ligações cruzadas entre DNA e proteínas (CADET *et al.*, 1999). A interação de  $\bullet\text{OH}$  com pirimidinas (timinas e citosinas) nas posições 5 ou 6 do anel, pode produzir muitos tipos de lesões, sendo duas, mais abundantes e mais conhecidas, que são 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrotimina (timina glicol – Tg) e a 5,6-dihidroxi-5,6-dihidrocitosina (HERMES-LIMA, 2004). Além disso, esses radicais estão eficientemente envolvidos na abstração de um átomo de hidrogênio presente nos açúcares do DNA, com exceção do C2'. Em muitos casos, a formação de centros radicais em C3', C4' e C5' ocasionam na quebra da fita do DNA, enquanto a oxidação do C1' leva a formação de 2'-D-desoxiribonogalactona (CADET *et al.*, 1999). O  $\bullet\text{OH}$ , assim como o  $^1\text{O}_2$ , tem a capacidade de gerar 8-oxodGuo a partir da dGuo, porém o mecanismo para tal ocorre de forma diversa, e há competição com um outro produto, a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina-2'-desoxiguanosina (Fapy-dG) como mostrado na Figura 3. Um centro de nitrogênio-radical, chamado de 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosil

radical é um precursor comum para os dois produtos e, a relativa quantidade de cada um é dependente das condições do meio. A formação de 8-oxodGuo requer a perda de um elétron do intermediário radical (oxidação), enquanto que para formação de Fapy-dG, há necessidade de adição de um elétron (redução) seguida de fragmentação do radical (GAJEWSKI *et al.*, 1990).

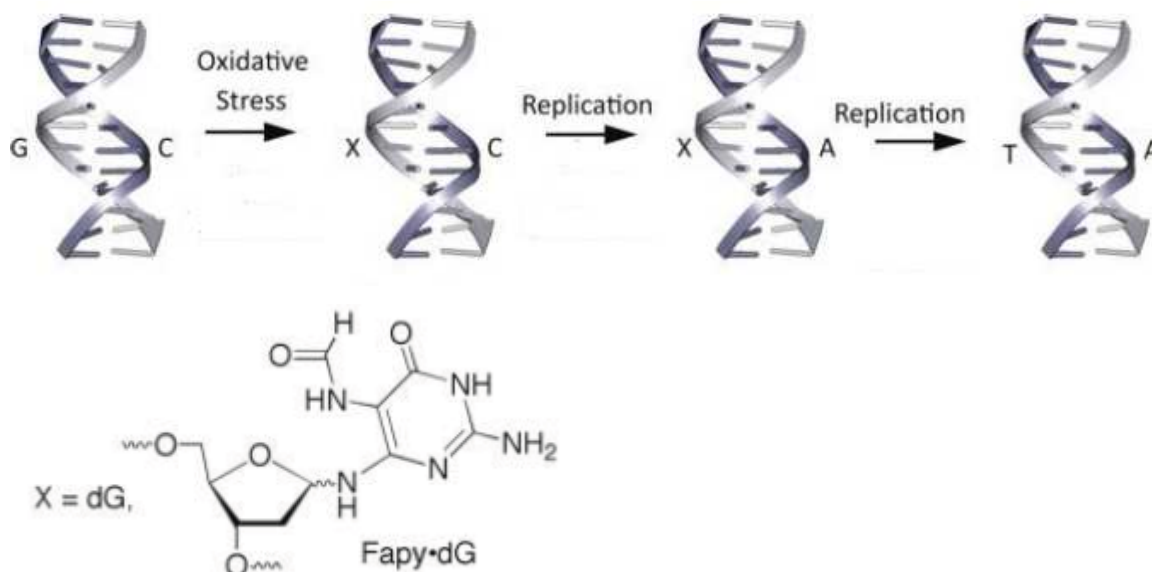


**FIGURA 3 - FORMAÇÃO DE FAPY-dG E 8-OXODGUO A PARTIR DE UM INTERMEDIÁRIO COMUM**

FONTE: Gajewski e colaboradores (1990).

NOTA: Os produtos de oxidação da dGuo (8-oxodGuo e Fapy-dG) pelo  $\bullet\text{OH}$ , são formados a partir de um mesmo precursor. A 8-oxodGuo é formada em condições oxidantes e a Fapy-dG é formada em condições redutoras.

Assim como a 8-oxodGuo, a Fapy-dG, formada no *pool* de desoxinucleotídeos também pode ser reconhecida pela enzima DNA-polimerase, diminuindo a sua fidelidade, podendo ser adicionada a nova fita de DNA na replicação (WIEDERHOLT e GREENBERG, 2002; DELANEY *et al.*, 2002). E ainda, essa espécie também tem preferência por parear com uma adenina, ao invés de citosina, podendo gerar uma mutação no DNA (Figura 4) (GREENBERG, 2011). Portanto, os dois principais produtos de oxidação formados pelo  $\bullet\text{OH}$  com a dGuo são altamente prejudiciais se não forem eliminados.



**FIGURA 4 - PAREAMENTO INCORRETO NO DNA PROVOCADO POR LESÕES DO TIPO FAPY-dG**

FONTE: Adaptada de Greenberg (2011).

NOTA: Lesões do tipo Fapy-dG, que aparecem quando guaninas do DNA sofrem oxidação por  $\bullet\text{OH}$ , podem parear erroneamente com adeninas e, na próxima replicação, a guanina anteriormente oxidada, dará vez a uma timina no DNA, consolidando a mutação.

### 2.2.3 Reparo do DNA

O pareamento específico das bases nitrogenadas do DNA, A com T e C com G, é crucial para a preservação da informação contida no genoma. No entanto, suas propriedades estruturais, bem como suas propriedades de pareamento são frequentemente afetadas, devido interação com agentes tóxicos de origem tanto exógena quanto endógena (FRIEDBERG, E. C., 2003; LINDAHL, T., 1993; PFEIFER *et al.*, 2003). As células são dotadas de capacidade de reconhecer e eliminar essas lesões, para tal, existem muitas vias de reparo no DNA, sendo que, para cada tipo de dano, existe uma via de reparo específica (PETERSON e COTE, 2004).

A via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER) é uma das principais ocorrentes no DNA. Esta via é responsável por eliminar um espectro mais amplo de danos causados ao genoma, incluindo fotoprodutos induzidos por UV, lesões

volumosas e distorções na hélice do DNA, ligações cruzadas e alguns danos oxidativos (ALTIERI *et al.*, 2008).

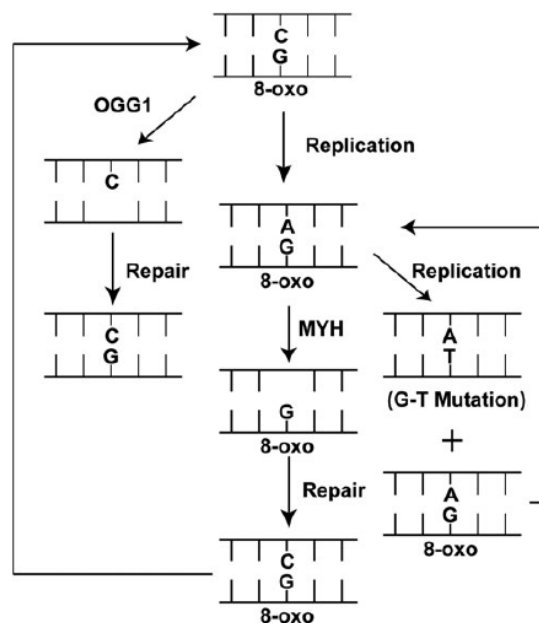
A via de reparo por excisão de base (BER), como o nome já sugere, está envolvida na excisão de bases lesionadas no DNA. BER é considerada como a via predominante para a proteção das células contra uma gama de lesões que resultam de oxidação, alquilação e desaminação das bases (ZHARKOV, 2008). Em se tratando de lesões oxidativas, esta é a via de maior relevância. Tal via é altamente conservada e possui muitos passos, que requerem a ação de inúmeras proteínas (WILSON e THOMPSON 1997). Há uma estimativa de que o DNA sofra lesão em aproximadamente 10.000 bases por dia, sendo que em sua maioria são reparadas por BER (BAUTE e DEPICKER, 2008; DAVID *et al.*, 2007; MAYNARD *et al.*, 2009).

O mecanismo de BER em eucariotos se inicia com a ação de uma DNA glicosilase, que reconhece a lesão na base nitrogenada e a remove do DNA, clivando a ligação *N*-glicosídica. Uma vez que a base foi removida pela glicosilase, o par resultante açúcar-fosfato é chamado de sítio abásico – apurínico ou apirimidínico (AP) (FROSINA *et al.*, 1996; HEGDE *et al.*, 2008). Esses sítios AP, são então substratos para as enzimas AP endonucleases, que clivam a ligação fosfodiéster imediatamente adjacente ao sítio AP, gerando um terminal 3'-OH e 2-desoxirribose-5-fosfato (dRP) em 5'. Algumas DNA glicosilases (DNA glicosilases bifuncionais) são também capazes de clivar os sítios AP. Essas rupturas são então preenchidas por uma DNA polimerase (POL $\beta$ ). Esta enzima incorpora o nucleotídeo correto e, quando necessário, remove o dRP em 5' através de sua atividade dRP liase. Após a ação da POL $\beta$ , o DNA é ligado pela ação da ligase 3 (LIG3). Esta é a chamada “Via Curta” do mecanismo de BER. A “Via Longa” ocorre quando o DNA sofre ação de DNA polimerases envolvidas na replicação do DNA, como POL $\delta$  ou POL $\epsilon$ . Nesse caso, há incorporação de 2 a 10 nucleotídeos, sendo que a fita substituída é removida pela DNase IV ou pela FEN1 (flap endonucleases I) e a ligação das fitas é realizada pela DNA ligase 1 (LIG1) (ALTIERI *et al.*, 2008; ZHARKOV, 2008).

Uma das enzimas mais amplamente estudadas para o reparo de lesões oxidativas no DNA é a OGG1, que é uma DNA glicosilase bifuncional (SVILAR *et al.*, 2011). Esta enzima é encontrada em humanos e ela reconhece lesões oxidativas do tipo 8-oxoG. Também já foi evidenciado que esta enzima reconhece outros tipos de lesões oxidativas, tais como Fapy-G. Em bactérias *E. coli*, esta enzima é denominada Fpg (formamidopirimidina-DNA-glicosilase), e é menos específica, pois

reconhece também lesões em outras purinas oxidadas (COSTE *et al.*, 2004). Existe ainda outra enzima responsável por reconhecer lesões em pirimidinas, sendo chamada Nth 1 (timina-glicol-DNA-glicosilase) para humanos e Endo III (endonuclease III) para *E. coli* (THAYNER *et al.*, 1995).

No entanto, falhas no reparo das lesões oxidativas no DNA antes da replicação podem ocorrer, o que pode posteriormente ocasionar em mutações no material genético. Voltando ao exemplo da 8-oxoG, esta lesão uma vez formada, tem preferência em parear com uma adenina, ao invés de citosina. Por sorte, em caso de pareamento incorreto, uma segunda via de BER é ativada e entra em ação uma enzima chamada de MYH glicosilase, também chamada de MUTYH. Esta enzima tem ação específica para adeninas pareadas erroneamente com lesões 8-oxoG. Esta é uma DNA glicosilase do tipo monofuncional e é a única enzima responsável pela remoção de uma base “normal” do DNA, oposta à base que sofreu lesão (SVILAR *et al.*, 2011). A Figura 5 a seguir, ilustra o mecanismo de ação das enzimas OGG1 e MYH, bem como a consequência de falhas na ação de ambas as enzimas.



**FIGURA 5 - MECANISMO DE AÇÃO DAS ENZIMAS OGG1 E MYH**

FONTE: SVILAR e colaboradores (2011).

NOTA: O reparo de 8-oxoG é mediado por OGG1 inicialmente (à esquerda). Se não reparado, a DNA polimerase tem preferência por inserir uma adenina oposta à 8-oxoG. A adenina incorporada erroneamente é reparada pela enzima MYH (centro). No entanto, se o pareamento incorreto não for reparado antes da próxima replicação do DNA, um par antes G-C, pode tornar-se um par T-A, consolidando a mutação (à direita).

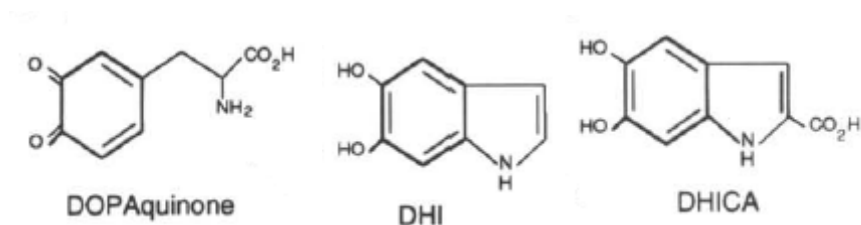
Além dos mecanismos de reparo, o nosso organismo ainda é dotado de algumas espécies com características protetoras, que se pronunciam antes que o dano efetivo as biomoléculas ocorram. Tais moléculas podem ser as enzimas antioxidantes como SOD e catalase, ou ainda algumas espécies capazes de reagir com as ROS, tornando-as total ou parcialmente inativas, tais espécies podem ser o tocoferol, carotenóides, bilirrubina e muitas outras (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). A eumelanina da pele, também pode ser considerada como protetora, uma vez que absorve radiação UVA, impedindo sua dissipação no ambiente celular, prevenindo assim a ocorrência de muitos danos em inúmeras biomoléculas, incluindo o DNA (KOBAYASHI *et al.*, 1998). A eumelanina tem inclusive, o papel de proteção do organismo contra a ação de algumas ROS, como  $^1\text{O}_2$  por exemplo. Em 2007, Wang e colaboradores realizaram um trabalho com eumelanina extraída de olhos de suíno e, foi verificado menor produção da espécie em questão, por rosa bengala irradiado, na presença do pigmento. Além disso, em 2012, Suzukawa e colaboradores analisaram o efeito de eumelanina frente a danos ao DNA plasmidial, na presença de  $^1\text{O}_2$  e, foi visto que na presença do pigmento, os danos causados pelo  $^1\text{O}_2$  ao DNA, foram significativamente menores. Os autores atribuíram esse efeito a um papel de *scavenger* de  $^1\text{O}_2$  realizado pela eumelanina.

### **2.3 EUMELANINA E SEU PRECURSOR, O ÁCIDO 5,6-DIHIDROXI-INDÓLICO (DHICA)**

A melanina é um pigmento epidérmico sintetizado em melanócitos pela ação da enzima tirosinase sobre o aminoácido tirosina. A síntese de melanina é regulada em vários pontos chaves que controlam a qualidade e a quantidade do pigmento produzido (HEARING e TSUKAMOTO, 1991). Tirosinase é conhecida como a enzima crítica para via melanogênica, uma vez que catalisa os passos iniciais e limitantes das reações que levam à produção do pigmento a partir do aminoácido tirosina (URABE *et al.*, 1994). Esta biossíntese leva a duas categorias de polímeros, a eumelanina, de coloração marrom e a feomelanina, de coloração avermelhada. O melanócito produz os dois tipos de polímero, porém em concentrações variadas, dependendo do indivíduo (ITO, 2003; SALOPEK *et al.*, 1991). Em particular, a eumelanina é um polímero heterogêneo, formado por três unidades monoméricas, o



ácido 5,6-dihidróxiindol-2-carboxílico (DHICA), o 5,6-dihidróxiindol (DHI) e a dopaquinona (Figura 6), em diferentes proporções (PROTA, 1980).



**FIGURA 6 - ESTRUTURA MOLECULAR DOS MONÔMEROS COMPONENTES DO POLÍMERO EUMELANINA**

Fonte: Adaptada de Urabe e colaboradores, 1994.

NOTA: A eumelanina é um polímero heterogêneo composto por unidades monoméricas em diferentes proporções de dopaquinona, dihidróxiindol (DHI) e ácido 5,6-dihidróxiindol-2-carboxílico (DHICA).

As pessoas negras têm uma incidência menor de câncer de pele e, confere-se a isso, o fato de que esses indivíduos possuem uma maior quantidade de eumelanina nos melanócitos e queratinócitos da pele (HILL e HILL, 1987). Mas o entendimento da fotoproteção da eumelanina ainda não está completo. Acredita-se que a maior contribuição deste pigmento é a de blindar a passagem de luz solar, pois ela absorve radiação, tanto na região do visível, quanto na região UV do espectro eletromagnético (KORYTOWSKI *et al.*, 1987). No entanto, alguns estudos têm mostrado que este polímero nem sempre exerce função protetora. A eumelanina em solução aquosa gera ROS quando irradiada. Foi verificado que irradiação direta (UVA e UVB) de eumelanina isolada leva a produção de  $O_2^{\bullet-}$  e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (FELIX *et al.*, 1978; SARNA *et al.*, 1980; SARNA *et al.*, 1984). Portanto, o papel fotoprotetivo *versus* fototóxico deste pigmento é uma questão importante. Suzukawa e colaboradores em 2012 mostraram que a eumelanina é capaz de induzir quebra em DNA plasmidial, mesmo na ausência de radiação. Os autores também constataram que o polímero pode interagir com os sulcos menores do DNA, prejudicando o acesso ao mesmo por enzimas de reparo, fato que indiretamente acentua as consequências do dano.

Outro aspecto importante que deve ser considerado é a contribuição que os precursores de eumelanina podem ter em relação aos efeitos do pigmento em si. O

DHICA está presente constantemente nas células onde sua concentração é estimada ser em torno de 10  $\mu\text{M}$ . Este composto é fotoquimicamente instável e sob irradiação leva à formação de radicais livres, que podem ser detectados por EPR (espectroscopia de ressonância paramagnética) (KOCH e CHEDEKEL, 1987). Alguns estudos têm mostrado que o DHICA pode induzir dano ao DNA na presença de radiação. Em particular, Routaboul e colaboradores (1995) comprovaram o aparecimento de quebra em DNA plasmidial quando este foi incubado com DHICA na presença de radiação UVB. Kipp e Young (1999) verificaram o aparecimento de quebra no DNA em células de queratinócitos humanos na presença de radiação UVA. Ambos os autores mostraram que este mecanismo de quebra no DNA ocorre via presença de ROS, uma vez que após a adição de enzimas e compostos antioxidantes, tais como SOD (superóxido dismutase), catalase, manitol e histidina, os efeitos deletérios diminuíram. Pelos resultados destes experimentos, o  $^1\text{O}_2$  foi a espécie reativa de oxigênio que mais teria contribuído para o dano efetivo ao DNA. Urabe e colaboradores em 1994 mostraram uma diminuição da proliferação celular, de células de fibroblastos humanos quando ao meio de cultura foram adicionadas quantidades crescentes de DHICA. Nesse mesmo trabalho, a adição de catalase diminuiu a citotoxicidade do intermediário melanogênico, evidenciando o papel do  $\text{H}_2\text{O}_2$  neste processo.

Ademais, o tempo de vida do monômero DHICA no estado excitado é maior do que do polímero em si, fato que o torna mais susceptível a reagir com as biomoléculas que o rodeiam. Em um trabalho publicado em 2008, Gauden e colaboradores verificaram que o tempo de vida no estado excitado de oligômeros de DHICA é menor do que do derivado monomérico. Esse fenômeno, presente nos oligômeros, foi atribuído à transferência de prótons intramolecular no estado excitado (ESIPT) que leva a uma rápida desativação. Os autores fazem uma analogia ao DNA, onde ESIPT é observado e, é de extrema importância, visto que moléculas no estado excitado com longos tempos de vida poderiam submeter o DNA a uma gama de reações mutagênicas.

É importante considerar que a eumelanina é sintetizada dentro dos melanossomos e, supostamente está restrita a este compartimento, não podendo assim atingir o DNA celular. Porém, quando a célula é submetida a um estado de estresse como, por exemplo, exposição à radiação solar, a síntese de eumelanina é aumentada, o que torna possível que os precursores ou até mesmo a própria

eumelanina, escape do local de sua síntese e atinja o núcleo celular, podendo então, danificar o seu material genético (HILL e HILL, 1987).

Dentre outros efeitos do DHICA no organismo humano, foi verificado que o mesmo contribui no bronzeamento da pele durante a exposição solar. Maeda e Hatao (2004) mostraram que este monômero também está presente nas camadas basal e suprabasal da epiderme fora dos melanócitos, onde sofre oxidação após radiação UVA (20 J/cm<sup>2</sup>, 340-400 nm), formando um polímero, que dá a pigmentação bronzeada à pele. Eles também mostraram que esse efeito é significativamente aumentado pela irradiação UVA *in vitro* do DHICA (1 mM) na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1%).

Além dos efeitos nocivos apresentados pelo DHICA, recentemente descobriu-se que este possui também algumas características benéficas e ainda contribui na comunicação intercelular. Kovacs e colaboradores, em 2012, utilizaram o monômero puro e células de queratinócitos humanos (NHK) para avaliar esses efeitos. Neste trabalho, colocaram-se as células em contato com o DHICA e, verificou-se que o mesmo tem habilidade de induzir a expressão de marcadores de diferenciação e das enzimas SOD e catalase, bem como o aumento da atividade das respectivas enzimas. Este fenômeno ocorre devido ao aumento da expressão de hormônios de ação nuclear, PPAR- $\alpha$  ("*Peroxisome proliferators-activated receptors*") promovida pelo DHICA. Estes hormônios são os responsáveis pela diferenciação dos queratinócitos e aumento da expressão e atividade das enzimas antioxidantes. Este estudo revela uma participação positiva do DHICA na homeostase e proteção da pele.

Outra característica protetora do DHICA foi encontrada por Novellino e colaboradores, em 1999. O trabalho mostra que a degradação da dGuo pelo  $\bullet$ OH (gerado através de reação de Fenton) na presença do precursor foi menor do que na ausência. Os autores acreditam que o DHICA impeça parte da reação de Fenton, por reagir com o Fe(II) e juntos formarem um complexo com pico de absorção diferente da absorção do DHICA sozinho, comprovado por espectrometria de absorção UV-VIS.

A elucidação completa do papel e do mecanismo com o qual o DHICA age no organismo humano permanece em questão. Até o momento não está claro se fora do melanossomo, este precursor age contra ou a favor da manutenção do equilíbrio. O que se pode concluir a priori, é que há um contrabalanço entre os efeitos

deletérios e protetores do DHICA. Este precursor pode agir favorável ou desfavoravelmente ao sistema dependendo da situação em que se encontra o ambiente celular.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o mecanismo de ação do precursor de eumelanina, o DHICA, no dano ao DNA na presença ou ausência de ROS. Dentro desse objetivo, buscou-se elucidar o tipo de interação existente entre o precursor e o DNA, bem como sua interferência no processo de reparo e ainda, avaliar os efeitos do precursor nos produtos de oxidação da dGuo.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para o cumprimento do objetivo geral, o trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- a) Investigar o aparecimento de quebra das fitas do DNA e a formação de lesões oxidativas em DNA plasmidial incubado com DHICA na presença e ausência de  $^1\text{O}_2$ ;
- b) Avaliar o tipo de interação existente entre o DHICA e o DNA, utilizando ensaio de competição com o intercalante brometo de etídeo;
- c) Avaliar o efeito do DHICA sobre a atividade da enzima Fpg, utilizando como substrato oligonucleotídeo contendo em sua estrutura uma lesão do tipo 8-oxoG;
- d) Utilizar o nucleosídeo livre, dGuo, para estudar os produtos de oxidação desta base nitrogenada, frente às ROS,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\bullet\text{OH}$ , na presença ou ausência de DHICA.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES

O ácido 5,6 dihidroxi-indol-2-carboxílico (DHICA) foi sintetizado segundo Charkoudian e Franz (2006) pela Prof<sup>a</sup> Dra. Daniela de Luna Martins do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF), Rio de Janeiro – RJ. O derivado de naftaleno, *N,N'*-di-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida (DHPN) foi sintetizado segundo Martinez e colaboradores (2000), pelo Prof<sup>o</sup> Paolo Di Mascio do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP. Ambos os compostos foram gentilmente nos cedidos para a realização deste trabalho.

O DNA plasmidial utilizado neste trabalho foi obtido comercialmente pela Thermo Scientific e as enzimas Fpg e Endo III foram obtidas da New England Biolabs. A dGuo e a 8-oxodGuo foram adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical, os oligonucleotídeos foram adquiridos da Midland Certified Reagent Company Inc. of Midland, Texas. O cloreto de ferro (II) tetra hidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) e o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foram obtidos da Sigma e da Merck respectivamente. Foi utilizada agarose padrão adquirida da Sigma e os solventes grau HPLC, acetonitrila e metanol, foram adquiridos da J.T.Baker.

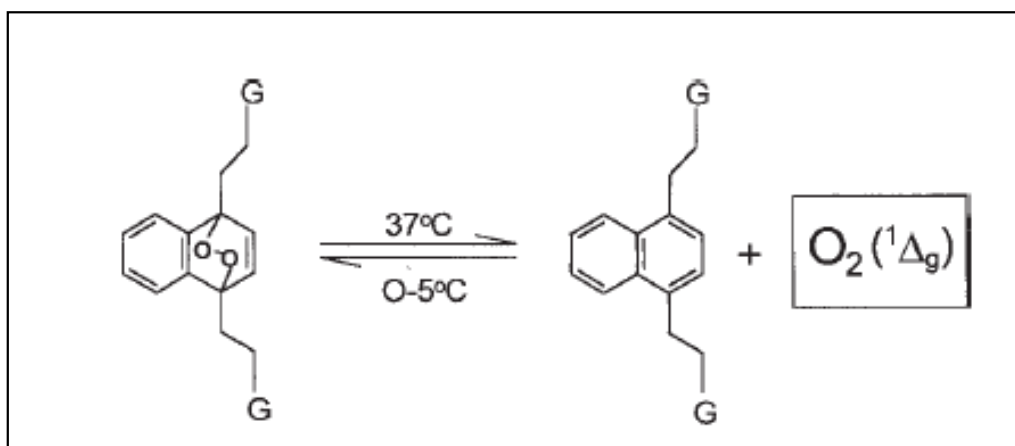
### 4.2 SISTEMAS GERADORES DE $^1\text{O}_2$

#### 4.2.1 Endoperóxido da *N,N'*-di-(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanamida (DHPNO<sub>2</sub>)

O DHPNO<sub>2</sub> foi sintetizado por fotossensibilização do DHPN (PIERLOT *et. al.*, 2000). Para isso foi preparada uma solução contendo 2 mL de água deuterada e 5 µL de azul de metileno (10 mg/mL) e 200 mg de DHPN. A reação se processou a 4°C, sob o borbulho de O<sub>2</sub> e irradiação de uma lâmpada de 500 W. Após 3 horas, a absorbância da solução começou a ser medida em 288 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (UV – 2450 Shimadzu) e esta avaliação passou a ser realizada a cada 1 hora, até que a concentração e a pureza do DHPNO<sub>2</sub> alcançaram

níveis aceitáveis ( $\geq 150$  mol/L e  $\geq 85\%$  respectivamente), o qual foi posteriormente armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

O DHPNO<sub>2</sub> se decompõe à  $37^{\circ}\text{C}$  em  $^1\text{O}_2$  e no seu derivado de naftaleno correspondente (DHPN) (Figura 7). O tempo necessário para total decomposição deste endoperóxido nessa temperatura é de 2 h e 30 min.



**FIGURA 7 - REAÇÃO DE DECOMPOSIÇÃO DO ENDOPERÓXIDO DHPNO<sub>2</sub> À  $37^{\circ}\text{C}$**

FONTE: Martinez e colaboradores (2000).

NOTA: O endoperóxido DHPNO<sub>2</sub>, se decompõe à  $37^{\circ}\text{C}$  no seu derivado de naftaleno DHPN e em  $^1\text{O}_2$ . Já a sua síntese é realizada de 0 a  $5^{\circ}\text{C}$ , através da reação entre o DHPN e o  $^1\text{O}_2$ .

#### 4.2.2 Fotossensibilização

A fotossensibilização utilizada como sistema gerador de  $^1\text{O}_2$  neste trabalho fez uso do corante rosa bengala (RB), que absorve luz visível e no estado excitado pode transferir sua energia de excitação ao  $\text{O}_2$  presente no meio reacional, transformando-o em  $^1\text{O}_2$ . Para isso, foi empregada uma câmara de LED ( $\lambda=526$  nm) para irradiação das amostras. A câmara de LED utilizada foi construída de acordo com Suzukawa, 2012 no nosso laboratório. As concentrações de RB e os tempos de irradiação estão especificados no item 4.5.3.

### 4.3 ENSAIOS COM DNA PLASMIDIAL

Para os ensaios com DNA plasmidial, uma parte foi realizada com o plasmídeo pUC18, extraído da bactéria *E. coli* através do kit Nucleobond (*midprep*). A bactéria foi previamente transfectada com o plasmídeo e gentilmente nos cedida pelo Núcleo de Fixação de Nitrogênio do Depto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba –PR. Outra parte do trabalho utilizou-se o pUC18 obtido comercialmente da Thermo Scientific. O DNA extraído pelo kit foi chamado de “extraído” e o DNA obtido comercialmente foi chamado de “comercial”. Para todos os ensaios realizados com DNA plasmidial, ao término das reações foi adicionado FSUDS (Tris-HCl 65 mM; EDTA 1,75 mM; Ficoll 10%, SDS 1%; azul de bromofenol 0,02%; pH 8) ao meio e, em seguida as amostras foram submetidas a congelamento à -20 °C.

#### 4.3.1 Extração do DNA plasmidial

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se o protocolo do kit Nucleobond, bem como os reagentes fornecidos por ele, os quais possuem constituição não declarada. Utilizaram-se bactérias do tipo *E. coli* transfectada com pUC18 congelada em glicerol. As bactérias foram aplicadas em uma placa de petri contendo 25 mL de meio LA com 0,08 mg/mL de estreptomicina, 0,1 mg/mL de ampicilina e 0,001 mg/mL de X-galactose. A cultura permaneceu na estufa, à 37 °C, *overnight*. Na sequência, coletou-se uma colônia com palito estéril em 3 mL de meio LB em frasco estéril, contendo 0,08 mg/mL de estreptomicina e 0,1 mg/mL de ampicilina. Deixou-se crescer *overnight* em atmosfera controlada à 37 °C. Ampliou-se a cultura para 200 mL de meio LB, também contendo estreptomicina e ampicilina nas concentrações especificadas acima, deixando crescer também *overnight* à 37 °C. Mediu-se a DO (densidade óptica) em 600 nm, que deveria ser igual ou maior que 2. Colocou-se a cultura de bactérias em um *falcon* de 50 mL e centrifugou-se à 3220 g (rcf) por 15 min, à 4 °C em uma centrifuga eppendorf 5810 R. Descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* completamente em 8 mL tampão de ressuspensão (RES) contendo RNase (60 µg/mL) . Adicionaram-se 8 mL do tampão



de lise (LYS) e incubou-se por 5 min. Ao lisado, adicionaram-se 8 mL de tampão de neutralização (NEU). Aplicou-se esta solução em um filtro, sobreposto em uma coluna e deixou-se a mistura descer por gravidade, sobre um tubo *falcon* de 50 mL. Descartou-se o filtrado. Na sequência, lavou-se o filtro com 5 mL de tampão de equilíbrio (EQU) e descartou-se o filtrado. Feito isso, descartou-se o filtro sobreposto na coluna. Lavou-se a coluna com 8 mL de tampão de lavagem (WASH) e descartou-se o filtrado. A coluna possuía em sua extremidade inferior um filtro permanente, no qual o plasmídeo ficou retido. Colocou-se a coluna sobre um novo tubo *falcon* e eluiu-se o plasmídeo com 5 mL de tampão de eluição (ELU). Aliquotou-se o eluído (plasmídeo) em microtubos de 1,5 mL. Para cada 1 mL aliquotado, foram adicionados 400 µL de isopropanol, e colocou-se a mistura para descansar por 2 min. Em seguida, centrifugou-se à 15000 g por 30 min, à 4 °C. Descartou-se o sobrenadante com cuidado. Adicionaram-se 200 µL de álcool 70% a cada 1 mL de pellet e centrifugou-se à 15000 g, por 5 min, a temperatura ambiente. Removeu-se o etanol e deixaram-se os microtubos à temperatura ambiente por 10 min até secagem total. Redissolveu-se o plasmídeo em 100 µL de água estéril livre de nuclease. Verificou-se a concentração do DNA por espectrofotômetro do tipo Nanodrop (Nanodrop 1000 - Thermo Scientific) e sua qualidade foi avaliada como descrito no item 4.3.5 por eletroforese em gel de agarose.

#### **4.3.2 Incubação do DNA com DHICA**

O DNA extraído (13,3 ng/µL) foi incubado com DHICA (2 mM) em tampão fosfato (pH 7, 10 mM), em um *shaker* (200-250 rpm) por 2h30min, à 37 °C protegido da luz. Feito isso, a porcentagem de quebra no DNA plasmidial foi avaliada por eletroforese como descrito posteriormente no item 4.3.5.

#### **4.3.3 Incubação do DNA com DHICA na presença de $^1\text{O}_2$**

Para verificar a influência do  $^1\text{O}_2$  no processo de quebra do DNA por DHICA, incubou-se o DNA (13,3 ng/µL) com DHICA (2 mM) e com DHPNO<sub>2</sub> (20 mM) separada e simultaneamente, em um *shaker* (200-250 rpm) por 2h30min, à 37 °C protegido da luz. O efeito do derivado de naftaleno correspondente a este

endoperóxido, o DHPN, também foi verificado, utilizando-se a mesma concentração do DHPNO<sub>2</sub> (20 mM) e incubando-se com o DNA, na ausência e presença de DHICA..

Incubou-se também, nas mesmas condições e concentrações, o DHICA com o DHPNO<sub>2</sub>, antes da incubação com o DNA, a fim de comparar a influência do DHICA oxidado e não oxidado no dano ao DNA.

A porcentagem de quebra foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (4.3.5).

#### **4.3.4 Incubação com as enzimas de reparo Fpg e Endo III**

A incubação com enzimas de reparo ocorre antes da corrida eletroforética e visa a avaliação de danos oxidativos em bases que não conseguem ser evidenciadas diretamente por essa técnica, visto que a simples oxidação da base não modifica a conformação do DNA plasmidial, não alterando sua velocidade de corrida no gel de eletroforese.

Foram utilizadas nesse trabalho as enzimas Fpg e Endo III, que reconhecem lesões oxidativas em purinas e pirimidinas respectivamente. Ambas as enzimas clivam o DNA no seu sítio de reconhecimento, transformando-o na sua forma circular aberta. Nos sistemas biológicos, a ação dessas enzimas é seguida por outras reações que levam à substituição da base oxidada por sua correspondente, restaurando a sequência de bases e garantindo o pareamento correto das mesmas na dupla hélice do DNA (DAVID *et al.*, 2007). Nos sistemas *in vitro*, não existem as outras enzimas e compostos necessários para o reparo completo do DNA e, a consequência de adicionar apenas as enzimas de clivagem, é que a porcentagem de quebra no DNA aumenta quando este se encontrar oxidado. Esta técnica é largamente utilizada para estudar lesões oxidativas no DNA (KUSHWAHA *et al.*, 2011; SUZUKAWA *et al.*, 2012).

Ao final das 2h30min de incubação descritas nos itens 4.3.1 e 4.3.2, alíquotas de 20 µL da reação foram retiradas e incubadas separadamente com as enzimas de reparo Fpg e Endo III por mais 30 min, no mesmo *shaker*, a 200-250 rpm, à 37 °C, protegido da luz. As soluções estoque de Fpg e Endo III possuíam concentração inicial de 8.000 U/mL e 10.000 U/mL respectivamente. As soluções foram diluídas de

acordo com o fabricante, na proporção de 1:100 em um meio com pH 8,0 contendo tris-HCl, NaCl, ditioneitol (DTT), EDTA, BSA e glicerol (concentrações mostradas na Tabela 2). No momento da incubação, essas soluções foram novamente diluídas na proporção de 1:10, utilizando um tampão com pH 8,0, respectivo para cada uma as enzimas (composição e concentrações mostradas na Tabela 3).

Verificou-se a porcentagem de quebra no DNA depois da incubação com as enzimas utilizando eletroforese em gel de agarose, como descrito no item 4.3.5.

	Tris-HCl (mM)	NaCl (mM)	DTT (mM)	EDTA (mM)	BSA (mg/mL)	Glicerol (%)
<b>Fpg</b>	20	50	-	0,5	200	50
<b>Endo III</b>	10	250	1	0,1	200	50

**TABELA 2 - COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE DILUIÇÃO 1:100 DAS ENZIMAS FPG E ENDO III**

FONTE: O autor (2013).

<b>Fpg</b>				<b>Endo III</b>		
NaCl	Tris-HCl	MgCl <sub>2</sub>	DTT	Tris-HCl	DTT	EDTA
<b>50</b>	10	10	1	20	1	1

**TABELA 3 - COMPOSIÇÃO E CONCENTRAÇÃO (MM) DOS TAMPÕES RESPECTIVOS PARA AS ENZIMAS FPG E ENDO III**

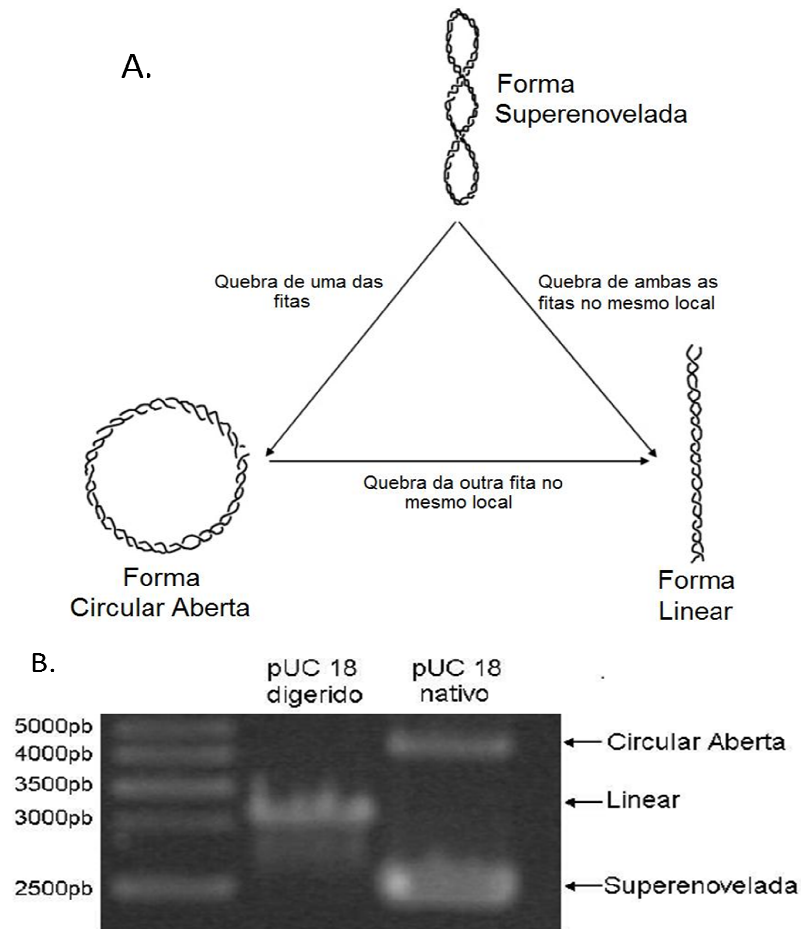
FONTE: O autor (2013).

#### 4.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Para o cálculo da porcentagem de quebra no DNA, deve ser levada em consideração as três formas possíveis de DNA plasmidial, que estão mostradas na Figura 8 (A). A primeira é a forma superenovelada, quando o DNA está íntegro e não sofreu nenhum tipo de quebra em sua estrutura. A segunda forma é a circular aberta, que aparece quando o DNA sofreu quebra em uma de suas fitas. Por fim, a terceira forma do DNA plasmidial, é a linear, onde só existe se o DNA sofrer quebra

em suas duas fitas. Essas três formas correm em um gel de agarose com velocidades diferentes como ilustrado na Figura 8 (B). A forma superenovelada corre mais rapidamente, a circular aberta corre em menor velocidade e a forma linear corre em uma velocidade intermediária entre as duas. Essa ferramenta é bastante utilizada para ensaios com DNA plasmidial, onde se verifica aumento ou não na porcentagem de quebra do DNA através da presença em maior ou menor quantidade das suas três formas (ROUTABOUL *et al.*, 1995; SUZUKAWA *et al.*, 2012).

Para preparo do gel utilizou-se agarose padrão diluída 1% em tampão TBE (Tris-borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8). As amostras foram então aplicadas e submetidas à uma corrida eletroforética, em uma cuba horizontal HE 33, GE Healthcare, por 2h30min em uma voltagem de 45 V fornecida por uma fonte EPS-301, GE Healthcare. Para visualização das bandas foi utilizado o intercalante brometo de etídeo (EtBr), onde o gel foi imerso em uma solução de aproximadamente 0,4 mg/μL de EtBr por 30 min e, em seguida imerso em água por 15 min. O gel foi revelado em um equipamento transluminador UVP (BioImaging Systems). As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ 1.43u software (Wayne Rasband – National Institute of Health – USA). Os valores de intensidade das bandas foram convertidos em porcentagem de DNA quebrado através da equação 7 e, as análises estatísticas foram feitas pelo teste ANOVA seguido por Tukey como *post hoc*. Foram considerados significativos valores de  $p \leq 0,05$ . Todos os ensaios de quebra do DNA plasmidial neste trabalho foram realizados de acordo com este item.



**FIGURA 8 - AS TRÊS FORMAS TOPOLÓGICAS DO DNA PLASMIDIAL E SUAS DIFERENÇAS NA CORRIDA ELETROFORÉTICA**

FONTE: SUZUKAWA, A. A. (2012).

NOTA: (A) O DNA plasmidial quando íntegro apresenta forma superenovelada e, a medida que sofre quebra em sua estrutura pode atingir conformação circular aberta (quebra em uma das fitas) ou linear (quebra em ambas as fitas). (B) As três formas topológicas do DNA possuem velocidades diferentes em uma corrida eletroforética. A forma superenovelada tem maior velocidade e se encontra mais abaixo no gel. A forma circular aberta tem menor velocidade e se encontra mais acima. Já a forma linear, possui velocidade intermediária entre as duas.

$$\% \text{ de quebra} = \frac{\text{forma circular aberta} + \text{forma linear}}{\text{forma circular aberta} + \text{linear} + \text{superenovelada} * 1,4} \times 100 \quad (7)$$

## 4.4 INTERAÇÃO DO DHICA COM O DNA

### 4.4.1 Adição de DHICA ao conjunto EtBr - DNA

A fim de determinar o tipo de interação que existe entre o DHICA e o DNA, um ensaio de competição utilizando EtBr foi realizado. O EtBr é largamente conhecido por sua habilidade de intercalar a dupla hélice do DNA, emitindo fluorescência entre 540 e 700 nm (LEPECQ e PAOLETTI, 1967). Neste intervalo de comprimento de onda, o EtBr por si só, emite uma pequena fluorescência, que é significativamente aumentada pela introdução de DNA ao meio. Quanto maior a quantidade de DNA adicionada, maior a fluorescência emitida, até que haja saturação do sistema.

Foi utilizada uma placa de 96 poços de paredes pretas (Costar) para a realização do experimento, onde quantidades crescentes de DNA (extraído) foram adicionadas à solução de EtBr (concentração final de 2,5  $\mu$ M) até que se alcançasse a concentração de DNA saturante. As amostras foram analisadas num leitor de microplacas, TECAN Infinity M 200 – R CHISTO, no modo fluorescência. Utilizou-se 475 nm para excitação das amostras e a emissão de fluorescência foi analisada no intervalo de 510 a 750 nm. Feito isso, foram preparadas em diferentes poços, soluções contendo EtBr (2,5  $\mu$ M), DNA na concentração saturante e tampão fosfato, pH 7, 10 mM, com diferentes concentrações de DHICA (0,75; 1,50; 2,25; 3,00; 3,75; 4,5 e 5,5 mM) para verificar se ocorreria diminuição da emissão de fluorescência.

### 4.4.2 Adição de DHICA pré-oxidado ao conjunto EtBr - DNA

Com a finalidade de avaliar se o DHICA oxidado poderia intercalar o DNA, realizou-se um ensaio onde foi adicionado DHICA pré-oxidado pelo  $^1\text{O}_2$  ao sistema EtBr-DNA. Para isso, o DHICA (4 mM) foi pré-incubado com DHPNO<sub>2</sub> (40 mM), por 2,5 h, em um *shaker*, à 37 °C, protegido da luz. Em seguida adicionou-se a mistura ao sistema EtBr – DNA em uma placa de 96 poços de paredes pretas, onde a concentração final de DHICA e DHPNO<sub>2</sub> foi de 2 e 20 mM respectivamente. Procedeu-se a análise no leitor de microplacas, utilizando 475 nm como

comprimento de onda de excitação e para a emissão, utilizou-se o intervalo de 510 a 750 nm.

#### **4.5 INFLUÊNCIA DO DHICA NA ATIVIDADE DA ENZIMA FPG**

Como descrito no item 2.3.1, o  $^1\text{O}_2$  oxida exclusivamente guaninas no DNA formando 8-oxoG. Sendo a guanina, uma base do tipo purina, estando no seu estado oxidado, ela se torna alvo das enzimas de reparo do DNA responsáveis pela excisão de purinas oxidadas e, como descrito no item 4.3.3, a Fpg pertence a essa classe de enzimas. Com a finalidade de verificar se o DHICA interfere na atividade da Fpg, o primeiro passo foi oxidar o DNA com  $^1\text{O}_2$ , para promover as lesões do tipo 8-oxoG, para que servissem de alvos de clivagem da enzima.

##### **4.5.1 Preparo do DNA oxidado**

Incubou-se o DNA extraído (13,3 ng/ $\mu\text{L}$ ) com DHPNO<sub>2</sub> (20 mM) e tampão fosfato 10 mM, pH 7, em um *shaker*, com agitação entre 200 e 250 rpm, por 2h30min, à 37 °C, protegido da luz.

##### **4.5.2 Incubação do DNA oxidado com Fpg na presença de DHICA**

À solução de DNA oxidado obtido conforme descrito no item anterior, adicionou-se a enzima Fpg (concentração especificada no item 4.3.4), na presença e ausência de DHICA (2 mM). Verificou-se por eletroforese em gel de agarose (item 4.3.5), se o DHICA poderia interferir na capacidade da enzima de reconhecer as lesões oxidadas em purinas. O mesmo experimento foi realizado com a enzima Endo III, a fim de avaliar se o DNA estava oxidado apenas por lesões do tipo 8-oxoG ou se havia também se formado outros tipos de lesões, como em pirimidinas.

### 4.5.3 Ensaio de competição

Realizou-se também um ensaio onde concentrações crescentes de DNA competidor (não oxidado) (McNEILL *et al.*, 2004) foram adicionadas à uma incubação do DHICA com o DNA oxidado. O conjunto foi posteriormente submetido à incubação com a enzima Fpg. A finalidade deste experimento é avaliar se o DHICA, que supostamente esteja interagindo com o DNA lesionado, pode se deslocar destes sítios e interagir também com DNA não lesionado.

Nesta etapa do trabalho utilizou-se a fotossensibilização como sistema gerador de  $^1\text{O}_2$  para oxidação do DNA. Incubou-se em uma placa de 96 poços, o DNA (13,3 ng/ $\mu\text{L}$  - comercial) juntamente com RB (10  $\mu\text{M}$ ) por 1h30min, em uma câmara de LED ( $\lambda = 526 \text{ nm}$ ). Em seguida, a reação foi transferida para um microtubo e incubada por mais 5 min com DHICA (2 mM) em um *shaker* a 200-250 rpm, à 37 °C, protegido da luz, para promover a interação do precursor com o DNA previamente oxidado. Ao final dos 5 min de incubação, separaram-se três alíquotas da reação em microtubos diferentes e adicionaram-se a cada um, DNA competidor nas concentrações 1, 2 e 3x mais concentrado (13,3; 26,6 e 53,2 ng/ $\mu\text{L}$  respectivamente) e, incubou-se as reações por mais 5 min. Findado este tempo, incubou-se todas as reações com a enzima Fpg (concentração especificada no item 4.3.4) por mais 30 min, no mesmo *shaker* e mesmas condições.

Um controle foi realizado, onde o DNA foi pré-incubado na câmara de LED na *ausência* de RB. Adicionou-se DHICA da mesma maneira, porém, foi adicionado DNA competidor apenas na concentração de 53,2 ng/ $\mu\text{L}$ .

Utilizou-se eletroforese em gel de agarose para a análise dos resultados e, o cálculo da quantidade de quebra no DNA foi realizado diferentemente do descrito em 4.3.5. Obteve-se a razão entre as áreas das bandas de DNA superenovelado (SE) e circular aberta (CA), como mostra a equação 8. Essa alteração na quantificação foi necessária devido a grande quantidade de DNA adicionado, o que promoveria a subestimação da porcentagem de quebra do DNA, já que a banda de superenovelado é bem mais intensa nesse caso.

$$\frac{SE*1,4}{CA} = \text{quantidade de quebra do DNA} \quad (8)$$



Também se realizou outro experimento, onde foi alterada a ordem de incubação das amostras. O DNA foi oxidado com RB exatamente como mostrado acima. Em seguida se processou a incubação do DNA oxidado com o DNA competidor (apenas na concentração de 53,2 ng/μL – 3x) por 5 min em um *shaker* a 200-250 rpm, à 37 °C, protegido da luz. Posteriormente adicionou-se DHICA (2 mM) à reação e incubou-se por mais 5 min no mesmo *shaker* e mesmas condições. Na sequência, incubou-se as amostras com a enzima Fpg (concentração mostrada no item 4.3.4) por 30 min, também no mesmo *shaker* e mesmas condições. Este experimento teve a finalidade de verificar se a capacidade de interação do DHICA é a mesma para os dois tipos de DNA (lesionado e não lesionado), pois existindo simultaneamente os dois tipos de DNA em solução, o DHICA pode se distribuir igualmente entre eles. A porcentagem de quebra no DNA também foi calculada de acordo com a equação 8.

Também foram feitos experimentos a fim de comprovar que a ação do RB se dá apenas na presença de luz. No escuro não ocorre formação de  $^1\text{O}_2$  e, consequentemente não ocorre a oxidação do DNA.

Para isso, duas placas de 96 poços foram preparadas. Nas duas placas adicionou-se em um dos poços apenas DNA (13,3 ng/μL - comercial) e em outro poço DNA (13,3 ng/μL) mais RB (5 μM). Uma das placas foi submetida à irradiação em uma câmara de LED ( $\lambda = 526$  nm) por 1h. A outra placa foi coberta com alumínio, a fim de bloquear a passagem de luz, também por 1h. Em seguida, as reações foram transferidas a microtubos separadamente e incubadas com as enzimas Fpg e Endo III (concentrações mostradas no item 4.3.4 Tabelas 2 e 3), em um *shaker* por 30 min, à 37 °C, protegido da luz. Estes resultados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (4.3.5).

## 4.6 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DA FPG

### 4.6.1 Obtenção do oligonucleotideo

O oligonucleotideo (oligo) utilizado neste trabalho foi obtido comercialmente pela Midland e continha em sua estrutura uma lesão do tipo 8-oxoG e fluoresceína

incorporada na posição 5'. A sequência do oligo e sua fita complementar são as respectivas: 5'- (*fluorescein*) ATA TAC CGC G(**OG**)C CGG CCG ATC AAG CTT ATT - 3' e 3'-TAT ATG GCG CCG GCC GGC TAG TTC GAA TAA – 5', onde, **OG** = 8-oxoG. Para formar o duplex, os oligos foram anelados com sua fita complementar através da incubação das duas, na presença de 100 mM de KCl, à 95 °C por 5 min e, em seguida deixou-se a mistura resfriar à temperatura ambiente.

#### 4.6.2 Ensaio de pré-incubação

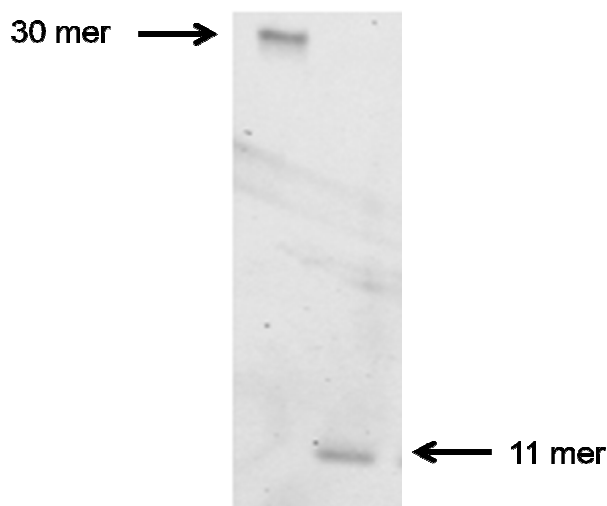
Com a finalidade de verificar se o DHICA poderia reagir e influenciar diretamente na atividade da enzima Fpg, promoveu-se a pré-incubação da enzima com o precursor nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 30 min à 0 °C e, em seguida adicionou-se o duplex à cada amostra e incubou-se o conjunto por 60 min, à 37 °C, protegido da luz. A concentração de enzima utilizada foi 0,1 U, com diluição de acordo com o item 4.3.4 e Tabela 2. As quantidades de DHICA e duplex adicionadas foram 1000 e 100 fmols respectivamente.

Também se realizou um ensaio, onde a prévia incubação continha as três espécies simultaneamente (enzima, DHICA e oligo), nas mesmas concentrações especificadas acima, nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 30 min. Em seguida incubou-se as amostras por 60 min, à 37 °C, protegido da luz. As reações foram paradas adicionando-se formamida 50% às amostras, que na sequência foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, como descrito no item 4.6.3 a seguir.

#### 4.6.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida é constituído de acrilamida 20% e ureia 7 M, diluídas em tampão TBE. Utilizou-se uma cuba vertical (SE 400 GE Healthcare), para a corrida eletroforética e no momento de aplicar o gel adicionou-se persulfato de amônio (APS) 10% e tetrametiletilenodiamina (TMED) na proporção de 1:10 entre os dois. O APS e o TMED reagem com a acrilamida formando uma reação em cadeia que irá promover a polimerização. As condições da fonte foram acertadas para 400 V, 300 mA e 15 W, sendo o tempo de corrida de 1h30min. O oligo fita dupla, deve ser desnaturado (se tornar fita simples) antes de ser aplicado no gel. Para isso as

amostras foram incubadas por 15 min, à 80 °C, protegidas da luz, antes da aplicação. O APS e o TMED também têm função de auxiliar na desnaturação do duplex. O gel foi revelado em um visualizador de fluorescência Typhoon TRIO (GE Healthcare). Como o oligo utilizado neste trabalho (tamanho 30 mer) possuía em sua estrutura uma lesão do tipo 8-oxoG, quando em contato com a enzima Fpg, a mesma promovia a clivagem do oligo nesta posição, restando um produto de 11 mer. O oligo íntegro e o produto de clivagem, correm no gel de poliacrilamida com velocidades diferentes. O produto corre mais rapidamente, se encontrando mais abaixo no gel e, o oligo íntegro corre mais vagarosamente, como a mostra a Figura 9.



**FIGURA 9. DIFERENÇA DE VELOCIDADE DE CORRIDA DE OLIGO ÍNTEGRO E CLIVADO POR FPG NUM GEL DE POLIACRILAMIDA**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: O oligo quando íntegro tem o tamanho de 30 mer e tem menor velocidade de corrida num gel de poliacrilamida. O mesmo tem em sua estrutura uma lesão do tipo 8-oxoG e, quando em contato com a enzima Fpg, sofre clivagem e o produto restante tem o tamanho de 11 mer e maior velocidade de corrida, se encontrando numa posição mais abaixo do gel.

#### **4.7 ENSAIOS COM 2'-DESOXIGUANOSINA**

##### **4.7.1 Incubação da dGuo com DHICA e ROS**

A dGuo (2 mM) foi incubada com DHICA (2 mM) na presença e ausência das ROS,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\bullet\text{OH}$ , por 2h30min em um *shaker*, a 200-250 rpm, à 37 °C,

protegido da luz. O  $^1\text{O}_2$  foi gerado através do DHPNO<sub>2</sub> na concentração de 20 mM, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi utilizado na concentração de 12 mM e o  $\cdot\text{OH}$  foi gerado através da Reação de Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - 12 mM e FeCl<sub>2</sub> - 3,75 mM) (HERRERA-MELIÁN *et al.*, 2000). Realizou-se a detecção dos produtos de oxidação da dGuo, tais como 8-oxodGuo e dSp utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – Shimadzu), de acordo com o especificado nos itens a seguir. A quantificação foi realizada utilizando-se uma curva de calibração com o padrão de cada substância, onde a dGuo e a 8-oxodGuo foram obtidas comercialmente e a dSp foi sintetizada como descrito em 4.7.2 pela aluna de doutorado da Universidade Federal do Paraná, Patrícia da Silva Peres (PERES, 2012). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA seguido de Tukey como *post-hoc*. Foram considerados significativos os resultados com  $p < 0,05$ .

#### 4.7.2 Síntese de dSp

A síntese de dSp foi realizada por fotossensibilização da dGuo (10 mM) com azul de metileno (0,02 mg/mL), utilizando uma lâmpada de 500 W, sob borbulho de oxigênio e temperatura de aproximadamente 15 °C (RAVANAT e CADET, 1995). A dSp formada como produto de oxidação da dGuo foi então purificada utilizando HPLC, por coluna Luna LC-NH<sub>2</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) sob fluxo de 0,8 mL/min e fase móvel constituída por 65 % de acetonitrila (ACN), 25% de formiato de amônio 25 mmol/L e 10% de metanol (MeOH). Depois de liofilizada, esta solução teve sua absorbância aferida em espectrofotômetro em 230 nm e a partir deste valor e de seu coeficiente de absorvidade ( $\epsilon = 5240 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{L}$ ), sua concentração foi calculada e a solução foi armazenada a -20°C.

#### 4.7.3 Detecção de 8-oxodGuo

Para detecção de 8-oxodGuo e dGuo utilizou-se uma coluna ACE LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), a qual foi mantida a 30°C sob fluxo de 0,8 mL/min com fase móvel constituída de 10% MeOH e 90% de solução 4 mmol/L de ácido cítrico, 8 mmol/L de acetato de amônio e EDTA 20 mg/L em pH 4,0. Para verificar a formação de 8-oxodGuo, utilizou-se detector eletroquímico, ESA Colouchem III (EC) com potenciais

de 130 e 380 mV para E1 e E2, respectivamente. Para verificar o consumo de dGuo utilizou-se, nas mesmas condições, detector UV-VIS, no comprimento de onda 254 nm (EBLIN *et al.*, 2006).

#### **4.7.4 Detecção de dSp**

Para detecção de dSp utilizou-se uma coluna Phenomenex LC-NH<sub>2</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm) mantida em 30 °C sob fluxo de 1 mL/min, com fase móvel constituída de 75% de acetonitrila e 25% de formiato de amônio 25 mmol/L. A detecção de dSp foi monitorada por detector UV-VIS em 230 nm (MARTINEZ *et al.*, 2002).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ENSAIOS COM DNA PLASMIDIAL

#### 5.1.1 Incubação do DNA com DHICA e $^1\text{O}_2$

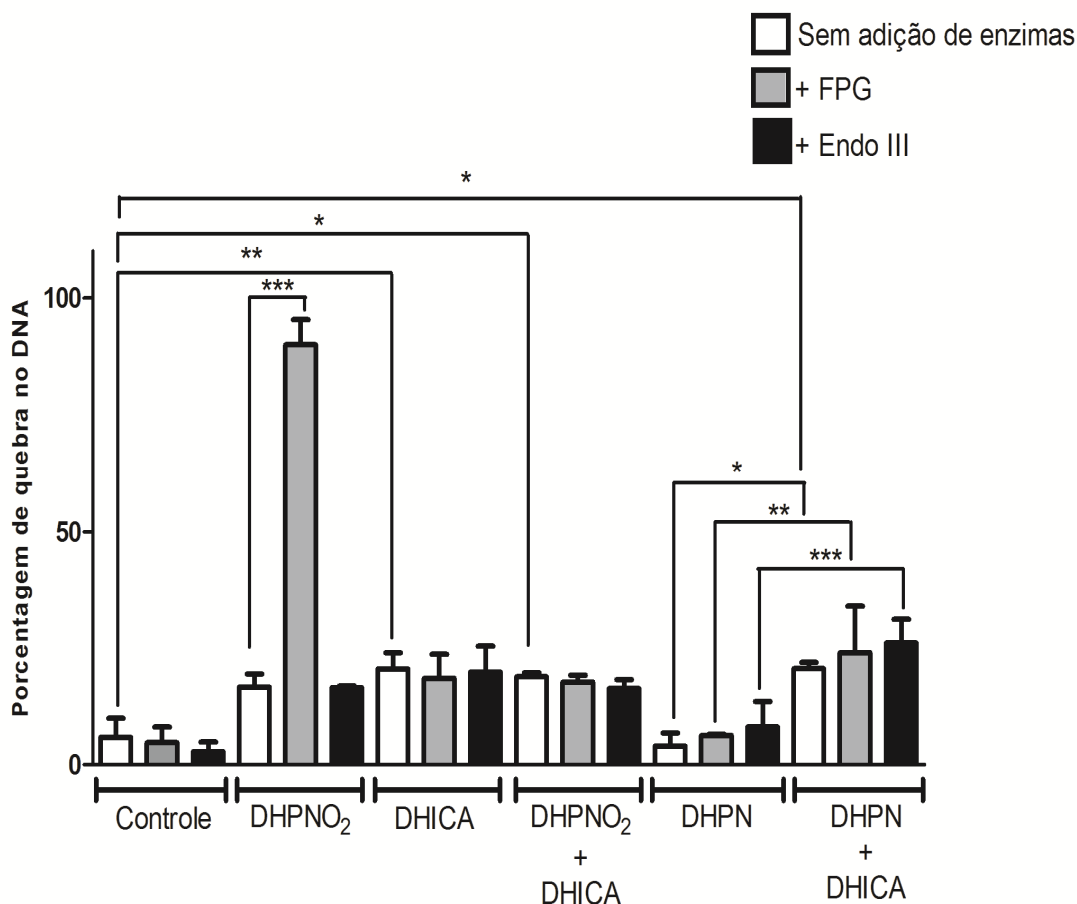
Realizou-se a incubação do DNA com DHICA na presença e ausência de  $^1\text{O}_2$ , utilizando como gerador desta ROS, o DHPNO<sub>2</sub>. O efeito do derivado de naftaleno correspondente a este endoperóxido, o DHPN, também foi analisado. Utilizou-se também, incubação com as enzimas de reparo no DNA, Fpg e Endo III, com a finalidade de observar o aparecimento ou não de lesões oxidativas no DNA. Os resultados estão mostrados na Figura 10.

Também se verificou o efeito da pré-oxidação do DHICA pelo DHPNO<sub>2</sub> e os resultados estão mostrados na Figura 11.

A partir dos resultados obtidos na Figura 10, observou-se que o DHICA sozinho foi capaz de promover quebra no DNA plasmidial, aumentando a porcentagem de quebra em cerca de 4 vezes, de 5 para 20% aproximadamente. Porém não foi capaz de promover lesões do tipo oxidativas, visto que a porcentagem de quebra não aumentou após a adição das enzimas de reparo, Fpg e Endo III.

Ainda na Figura 10, também se pôde perceber que o sistema gerador de  $^1\text{O}_2$ , o DHPNO<sub>2</sub>, promoveu um grande aumento no número de quebra após a adição da enzima Fpg, que é a enzima responsável pelo reconhecimento de lesões oxidativas em purinas. O mesmo não foi observado para o DHPN, pois não houve aumento no número de quebra no DNA, nem antes, nem depois da adição das enzimas de reparo, comprovando que este derivado de naftaleno não interfere nos resultados obtidos e que o efeito causado pelo DHPNO<sub>2</sub> é devido apenas ao  $^1\text{O}_2$ .

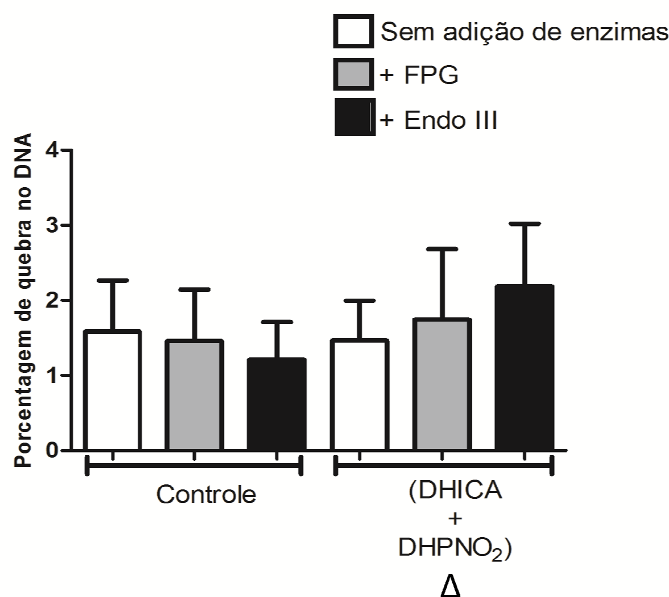
Um pequeno aumento na quebra também foi evidenciado pelo DHPNO<sub>2</sub> mesmo antes da adição da enzima Fpg. Essa porcentagem de quebra é devido provavelmente a re-oxidação da 8-oxoG à ácido oxalúrico, que ocorre em menor quantidade. O ácido oxalúrico é uma espécie mais lábil e pode sofrer hidrólise facilmente, resultando no aparecimento de quebra na fita do DNA. Esse mecanismo ainda não foi comprovado, mas é o mais aceito até o momento (RAVANAT *et al.*, 2001).



**FIGURA 10 - INCUBAÇÃO DO DNA COM DHICA, DHPNO<sub>2</sub> E DHPN**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: O DNA (13,3 ng/μL) foi incubado separada e simultaneamente com DHICA (2 mM) e DHPNO<sub>2</sub> (20 mM) ou DHPN (20 mM) em um *shaker*, à 37 °C, protegido da luz por 2h30min. Alternativamente, enzimas de reparo do DNA, Fpg (8 U/mL) e Endo III (10 U/mL) foram adicionadas ao meio e a solução foi incubada por mais 30 min à 37°C. O controle é referente ao DNA que não sofreu incubação com nenhuma das espécies. A porcentagem de quebra no DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de *Tukey* como *post-hoc*. (\*\* para P < 0,0001 e \* para P < 0,001).



**FIGURA 11 - PRÉ-OXIDAÇÃO DO DHICA PELO DHPNO<sub>2</sub>**

FONTE: O autor (2013).

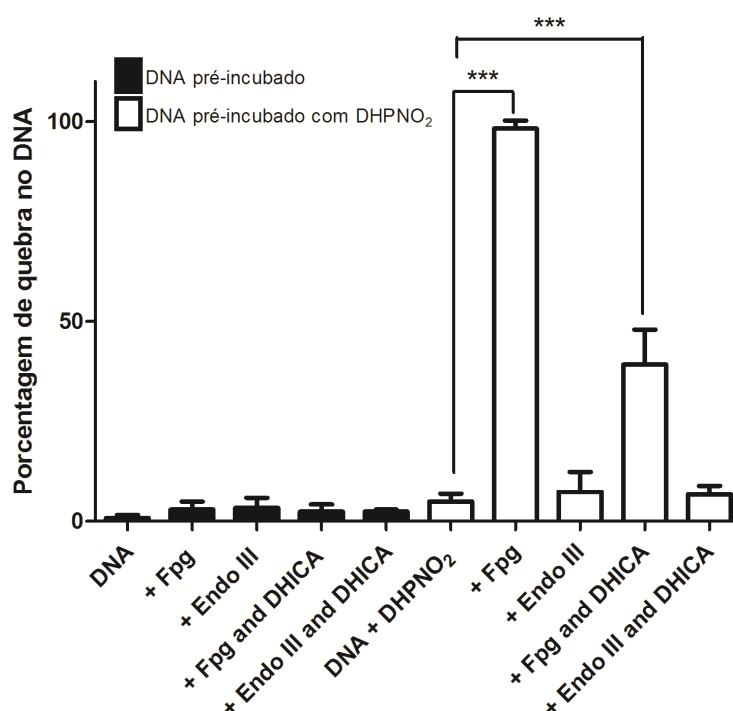
NOTA: O DHICA (2 mM) foi pré-incubado com DHPNO<sub>2</sub> (20 mM) – o símbolo Δ indica pré-incubação - em um *shaker*, por 2h30min, à 37 °C, protegido da luz. Em seguida adicionou-se DNA (13,3 ng/μL) à reação de pré-oxidação, e incubou-se a solução novamente em um *shaker*, por 2h30min, à 37 °C, protegido da luz. Alternativamente, enzimas de reparo do DNA, Fpg (8 U/mL) e Endo III (10 U/mL) foram adicionadas ao meio e a solução foi incubada por mais 30 min à 37 °C. o controle é referente ao DNA que não sofreu adição de DHICA pré-oxidado. A porcentagem de quebra no DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de *Tukey* como *post-hoc*. (\*\* para  $P < 0,0001$  e \* para  $P < 0,001$ ).

Outro dado relevante extraído deste experimento (Figura 10), foi o observado pela incubação do DNA com DHICA e DHPNO<sub>2</sub>, verificou-se nível de quebra semelhante à presença do DHICA sozinho e que não ocorreu aumento no número de quebra quando se adicionou a enzima Fpg à solução. Em particular, esse resultado foi inesperado, visto que havia <sup>1</sup>O<sub>2</sub> no meio e, este é conhecidamente capaz de induzir lesões oxidativas em guaninas que seriam reconhecidas pela enzima Fpg. Este resultado levantou a hipótese de que o DHPNO<sub>2</sub> estivesse reagindo preferencialmente com o DHICA, restando uma menor quantidade de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> para reagir com o DNA. Porém, pelos dados mostrados na Figura 11, é possível perceber que o DHICA quando pré-oxidado pelo DHPNO<sub>2</sub> perde essa sua capacidade de danificar o DNA. No entanto, existe ainda a possibilidade de que o DHICA possa interferir de alguma maneira na ação da enzima Fpg, o que fez com



que a mesma não reconhecesse as lesões oxidativas provocadas pelo  $^1\text{O}_2$  presente no meio reacional.

Para resolver essa questão, realizou-se a prévia oxidação do DNA pelo  $^1\text{O}_2$ , utilizando  $\text{DHPNO}_2$ , como descrito no item 4.5.1. Em seguida realizou-se a incubação do DNA oxidado com a enzima Fpg, na presença ou ausência de DHICA, como descrito em 4.5.2. Esta prévia oxidação do DNA teve a finalidade de excluir a hipótese de que o  $^1\text{O}_2$  pudesse reagir preferencialmente com o DHICA. Estando o DNA oxidado, a posterior incubação com a enzima Fpg, com e sem DHICA, teve o propósito de verificar se o mesmo poderia ou não perturbar a ação da enzima. O resultado está mostrado na Figura 12.



**FIGURA 12 - DNA PRÉ-OXIDADO COM DHPNO<sub>2</sub> E POSTERIOR INCUBAÇÃO COM AS ENZIMAS FPG E ENDO III, COM E SEM DHICA**

FONTE: O autor (2013).

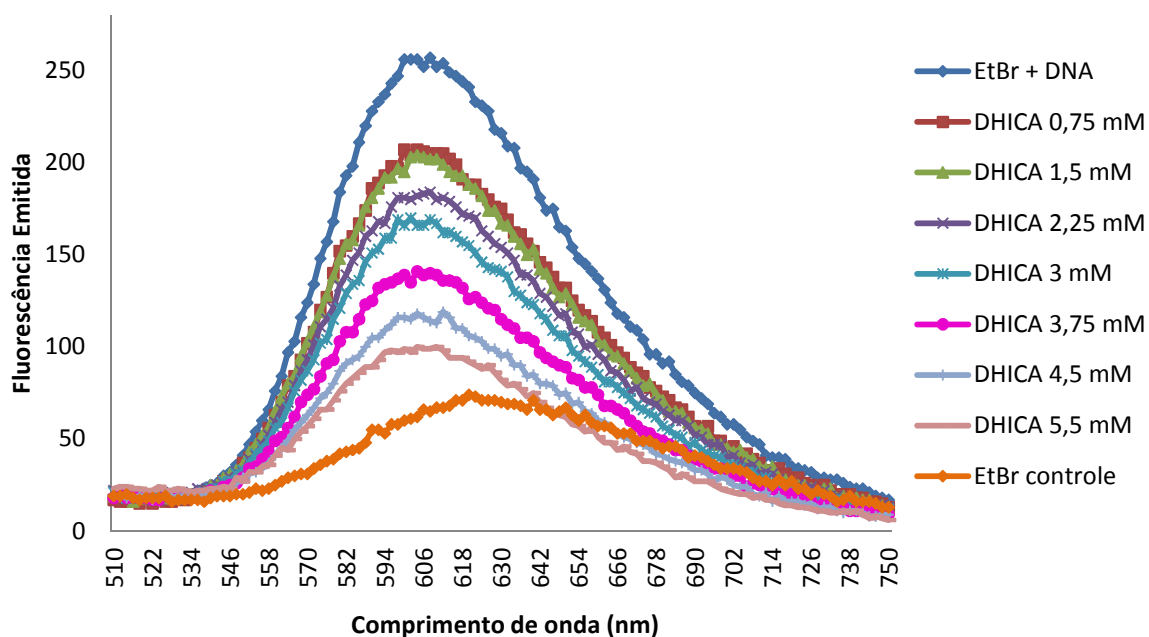
NOTA: O DNA (13,3 ng/ $\mu\text{L}$ ) foi incubado com  $\text{DHPNO}_2$  (20 mM) em um *shaker*, à 37 °C, por 2h30min. Na sequência, o mesmo foi incubado com as enzimas Fpg (8 U/mL) e Endo III (10 U/mL) na presença ou ausência de DHICA (2 mM), por mais 30 min, à 37 °C. A porcentagem de quebra no DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de *Tukey* como *post-hoc*. (\*\* para  $P < 0,0001$  e \*\* para  $P < 0,001$ ).

A Figura 12 mostra que a enzima Fpg, quando incubada sozinha com o DNA previamente oxidado, foi capaz de reconhecer as lesões do tipo oxidativas presente neste, o que pode ser observado através do aumento da porcentagem de quebra, de 3 para quase 100%. Novamente não houve aumento da porcentagem de quebra quando se adicionou a enzima Endo III ao sistema, o que era esperado, pois como já explicado acima, o  $^1\text{O}_2$  tem como alvo exclusivo no DNA, a base nitrogenada guanina. Já para a incubação do DNA oxidado com a Fpg na presença do DHICA, a porcentagem de quebra do DNA foi de aproximadamente 50%, sendo a metade do que na ausência deste composto. Este resultado mostra que o DHICA interfere de alguma maneira na atividade desta enzima.

### 5.1.2 Interação do DHICA com o DNA

Com os resultados mostrados acima, uma nova questão foi levantada. É visto que o DHICA faz com que a capacidade de reconhecimento da enzima Fpg aos sítios lesionados no DNA seja menor, mas essa diminuição pode ser atribuída tanto à interferência deste precursor diretamente ao sítio ativo da enzima, ou simplesmente devido à interação deste composto com o DNA, recobrindo as bases oxidadas e impedindo a enzima de alcançar os seus sítios de reconhecimento, mesmo estando inteiramente ativa.

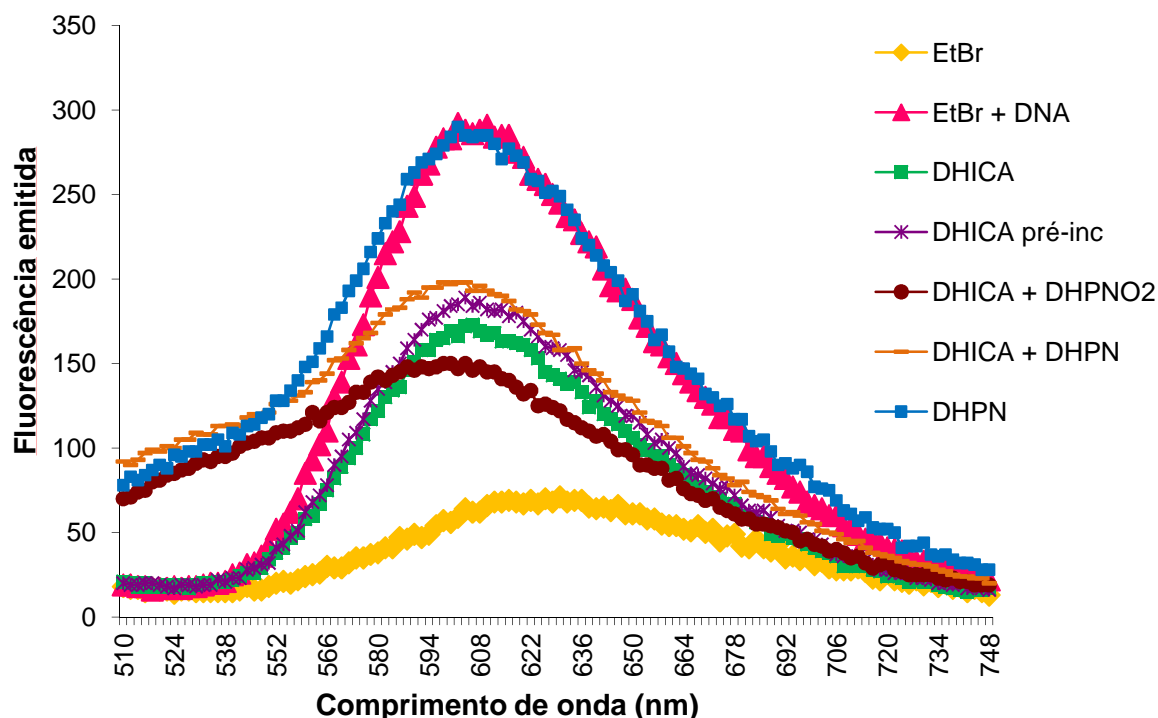
Com o objetivo de sanar esta dúvida, realizou-se o experimento descrito em 4.4.1, que verifica o tipo de interação entre o DHICA e o DNA. Neste experimento, encontrou-se a concentração de DNA saturante (aproximadamente 10 ng/ $\mu\text{L}$ ) no sistema EtBr-DNA e, em seguida, adicionou-se concentrações crescentes de DHICA para verificar se o mesmo poderia interferir nessa fluorescência emitida pelo conjunto EtBr-DNA. Os resultados estão mostrados na Figura 13 a seguir. Verificou-se também se o DHICA pré-oxidado pelo  $^1\text{O}_2$  também poderia influenciar nessa fluorescência. Primeiramente incubou-se o DHICA com DHPNO<sub>2</sub>, para promover a oxidação do precursor e, na sequência o adicionou ao conjunto EtBr-DNA. Os resultados estão mostrados na Figura 14.



**FIGURA 13. DIMINUIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DO SISTEMA EtBr-DNA PROMOVIDA PELO DHICA**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: Ao sistema saturado EtBr-DNA, que possui máxima emissão de fluorescência, adicionou-se DHICA em diferentes concentrações (mostradas na legenda do gráfico) e observou-se a influência na fluorescência emitida pelo sistema. O item “EtBr controle” da legenda é referente à emissão de fluorescência do EtBr sozinho sem adição de DNA. As amostras foram analisadas num leitor de microplacas, TECAN Infinity M 200 – R CHISTO, no modo fluorescência. O comprimento de onda de excitação foi de 475 nm e a emissão verificou-se no intervalo de 510 a 750 nm. O resultado mostra um de três experimentos independentes.



**FIGURA 14. DIMINUIÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DO SISTEMA EtBr-DNA PROMOVIDA PELO DHICA PRÉ-OXIDADO PELO DHPNO<sub>2</sub>**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: Ao sistema saturado EtBr-DNA, que possui máxima emissão de fluorescência, adicionou-se DHICA (2 mM) pré-oxidado pelo DHPNO<sub>2</sub> (20 mM) (mostrado na legenda do gráfico) e observou-se a influência na fluorescência emitida pelo sistema. Como controle, adicionou-se ao sistema EtBr-DNA, DHPN (20 mM) e DHICA (2 mM) pré-incubado com DHPN (2 mM). As amostras foram analisadas num leitor de microplacas, TECAN Infinity M 200 – R CHISTO, no modo fluorescência. O comprimento de onda de excitação foi de 475 nm e a emissão verificou-se no intervalo de 510 a 750 nm. O resultado mostra um de três experimentos independentes.

Como mostrado na Figura 13, a adição do DHICA ao sistema fez com que a fluorescência emitida diminuísse cerca de 45% para a concentração de 3,75 mM de DHICA e, essa porcentagem de diminuição foi crescendo conforme o aumento da concentração. Esses dados sugerem que o DHICA seja capaz de intercalar o DNA e esteja competindo pelos mesmos sítios de ligação do EtBr, promovendo o seu deslocamento e, por isso a diminuição da fluorescência.

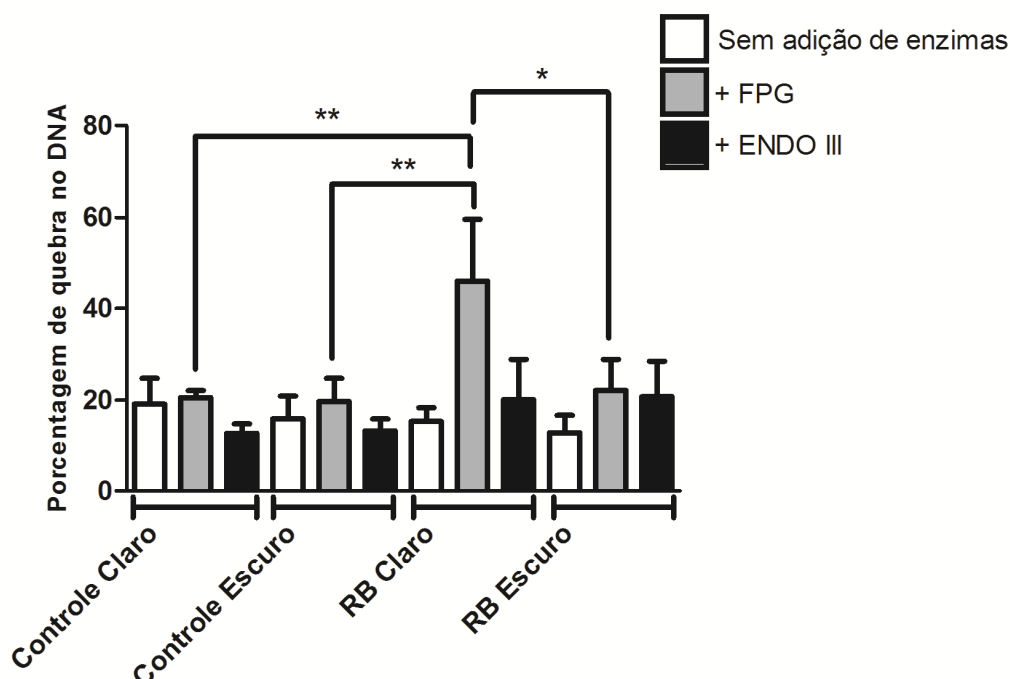
Na Figura 14, verifica-se que o DHICA pré-oxidado pelo DHPNO<sub>2</sub> também tem essa capacidade, sendo a diminuição da fluorescência equivalente a do DHICA não oxidado. Observa-se também que o DHPN sozinho não tem capacidade de

intercalação, já que não há diminuição da fluorescência quando este é adicionado ao meio. Esses resultados são condizentes com a hipótese de que o precursor esteja interagindo com o DNA e dificultando o alcance da enzima aos seus sítios de ligação e, por isso há menor porcentagem de quebra na presença do intermediário melanogênico.

### 5.1.3 Ensaio de Competição

Na tentativa de promover o deslocamento do DHICA donde estaria interagindo com o DNA e impedindo o alcance da enzima, realizou-se o experimento descrito em 4.5.3, utilizando RB e irradiação como sistema gerador de  $^1\text{O}_2$ . Com a finalidade de mostrar que o RB tem ação apenas na presença de luz e que no escuro não há formação de  $^1\text{O}_2$ , utilizaram-se duas placas de 96 poços, onde uma foi submetida à irradiação em uma câmara de LED e a outra foi coberta com alumínio para bloquear a passagem de luz. Ao final da incubação as amostras foram incubadas na presença das enzimas Fpg e Endo III, à 37 °C, protegido da luz. Os resultados estão mostrados na Figura 15.

Com esse experimento foi possível constatar que o RB tem ação de gerar  $^1\text{O}_2$  apenas no claro, como observado pelo aumento da porcentagem de quebra após a adição da enzima Fpg à essa amostra, de 20 para 50% aproximadamente. Não foi observado o mesmo aumento da porcentagem de quebra após adição de enzima Fpg, para as amostras incubadas no escuro, o que mostra claramente que o RB tem ação apenas na presença de luz e na ausência, não ocorre oxidação do DNA. Com isso, os demais experimentos utilizando este fotossensibilizador foram realizados apenas no claro.



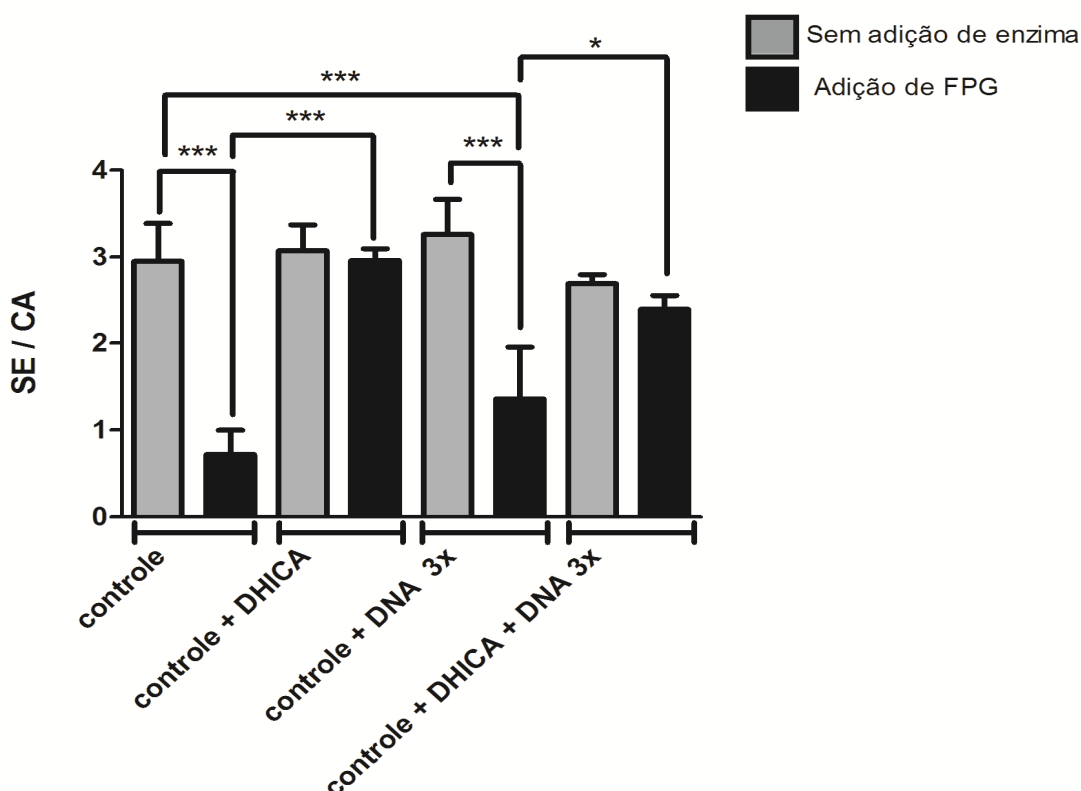
**FIGURA 15 - EXPERIMENTO CONTROLE – DNA INCUBADO COM E SEM RB, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE LUZ**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: O DNA (13,3 ng/μL) foi incubado na ausência (controle) e presença (RB) de RB (5 μM), em duas placas de 96 poços. Uma das placas foi submetida à irradiação em uma câmara de LED (claro), por 1 h e a outra foi coberta com alumínio (escuro), também por 1 h. Posteriormente as amostras foram incubadas com as enzimas Fpg (8 U/mL) e Endo III (10 U/mL), nas mesmas condições, por 30 min. A porcentagem de quebra no DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de *Tukey* como *post-hoc*. (\*\* para  $P < 0,0001$  e \*\* para  $P < 0,001$ ).

Promoveu-se então, a pré-oxidação do DNA com o fotossensibilizador RB, em uma câmara de LED. Em seguida, as amostras foram retiradas da câmara de LED e levadas a um *shaker*, com temperatura de 37 °C, protegido da luz. Adicionou-se ao meio, DHICA, para promover a interação deste com o DNA lesionado e incubou-se por 5 min. Posteriormente, DNA competidor foi adicionado em excesso de concentração (1, 2 e 3x mais concentrado que o DNA oxidado), para promover o deslocamento do DHICA de onde supostamente impedia o alcance da enzima aos seus sítios de ligação e incubou-se por mais 5 min. Finalmente as reações foram incubadas com a enzima Fpg, como descrito em 4.3.4. Para o controle (DNA pré-incubado na câmara de LED na *ausência* de RB) adicionou-se DNA competidor

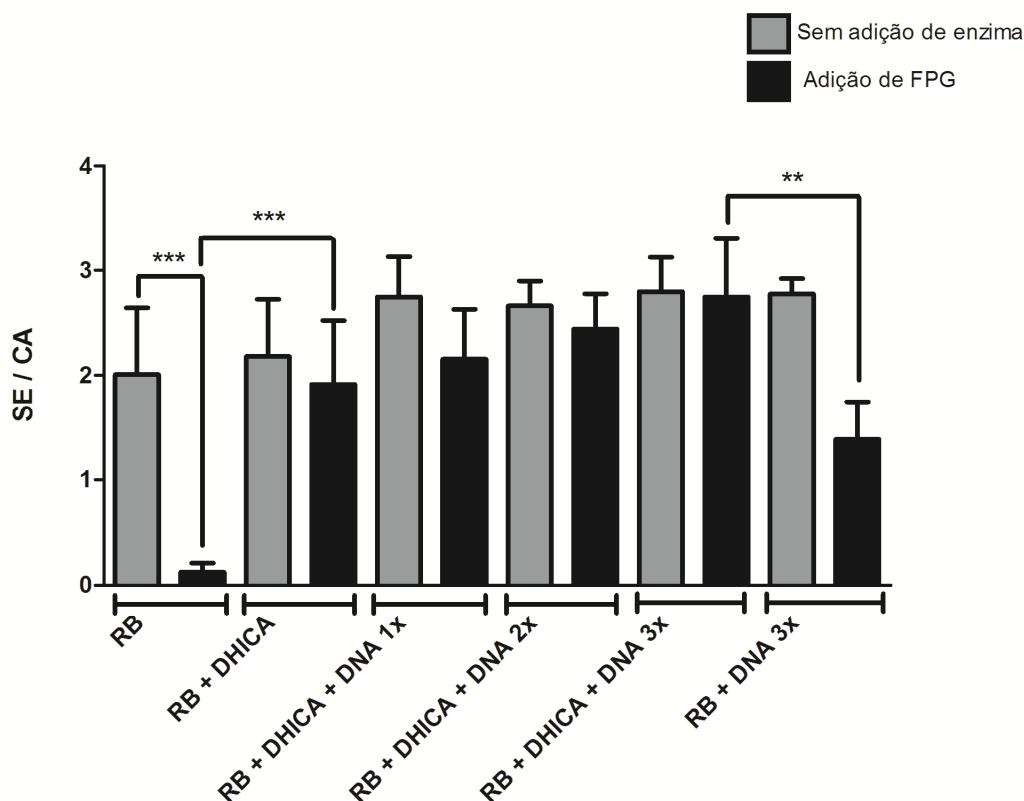
apenas na concentração de 53,2 ng/ $\mu$ L – 3x. Os resultados estão mostrados nas Figuras 16 e 17 a seguir, os dados foram obtidos em conjunto e separados em dois gráficos apenas para melhor visualização. A análise dos resultados foi realizada de acordo com a equação 8, pois ela deixa mais evidente o aumento ou diminuição no número de quebra, comparando-se com a análise fornecida pela equação 7, visto que a equação 8 leva em consideração apenas a razão entre as bandas superenovelada (SE) e circular aberta (CA).



**FIGURA 16 - ADIÇÃO DE DNA COMPETIDOR AO CONTROLE NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DHICA**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: O DNA (13, 3 ng/  $\mu$ L) foi incubado na ausência de RB (controle) por 1h30min em uma câmara de LED. Em seguida adicionou-se DHICA ao meio, incubou-se por 5 min em um *shaker*, à 37 °C, protegido da luz. Na sequência, adicionou-se DNA competidor 3x mais concentrado que o controle e incubou-se novamente por 5 min, no mesmo *shaker*, à 37 °C, protegido da luz. Posteriormente as amostras foram incubadas com a enzima Fpg (8 U/mL), nas mesmas condições, por 30 min. A porcentagem de quebra no DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). Os resultados são expressos como a média de quatro experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de *Tukey* como *post-hoc*. (\*\*\*) para  $P < 0,0001$  e \*\* para  $P < 0,001$ ).



**FIGURA 17 - ADIÇÃO DE DNA COMPETIDOR AO DNA PREVIAMENTE OXIDADO (RB) NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE DHICA**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: O DNA (13,3 ng/μL) foi incubado na presença de RB (10 μM) por 1h30min em uma câmara de LED. Em seguida adicionou-se DHICA ao meio, incubou-se por 5 min em um *shaker*, à 37 °C, protegido da luz. Na sequência adicionou-se DNA competidor nas concentrações de 1, 2 e 3x mais concentrado que o DNA oxidado e incubou-se novamente por 5 min, no mesmo *shaker*, à 37 °C, protegido da luz. Posteriormente as amostras foram incubadas com a enzima Fpg (8 U/mL), nas mesmas condições, por 30 min. A porcentagem de quebra no DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). Os resultados são expressos como a média de quatro experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de *Tukey* como *post-hoc*. (\*\* para  $P < 0,0001$  e \* para  $P < 0,001$ ).

Pode-se concluir que quanto maior a razão das áreas das bandas SE/CA, menos quebrado está o DNA e quanto menor essa razão, mais quebrado está o DNA. Sendo assim, a Figura 16 mostra que o controle tem por si só em sua estrutura algumas lesões oxidativas em purinas, o que ocasionou na diminuição da razão SE/CA, quando na presença da enzima Fpg, de 2,9 para 0,7 aproximadamente. Nestes experimentos com RB, utilizou-se DNA *comercial*, que estava mais oxidado



do que o *extraído* (utilizado nos experimentos anteriormente mostrados – Figuras 10 a 14). Além disso, o *cálculo* da quantidade de quebra foi diferente do utilizado na Figura 14, onde também foi utilizado DNA comercial. O DNA da Figura 16 parece ter em sua natureza mais bases oxidadas do que o DNA da Figura 15, porém este estado de oxidação para os dois casos é equivalente e, se tornou apenas *mais evidente* na Figura 16, devido a diferente forma de analisar (através da equação 8).

Já na presença de DHICA essa diminuição da razão SE/CA não foi observada e, manteve-se em cerca de 2,9 após a adição da enzima. Isso é condizente com os resultados anteriores, que mostraram que este composto interfere de alguma maneira na atividade da enzima. Quando se introduziu ao meio DNA competidor 3x mais concentrado, ao adicionar Fpg, a razão diminuiu de 2,9 para 1,3 aproximadamente. Porém na presença de DHICA, essa diminuição não foi observada e, a razão SE/CA ainda manteve-se em 2,9.

Para a Figura 17, os resultados foram equivalentes. O DNA previamente oxidado com RB aparece com uma pequena razão SE/CA, aproximadamente 0,12, após adição da enzima. Já para a amostra que continha DHICA, essa razão é bem maior, cerca de 1,9. Quando se adicionou DNA competidor 1, 2 e 3x mais concentrado que o DNA oxidado, para nenhuma das concentrações foi observada diminuição da razão SE/CA. O que se observou foi um ligeiro aumento, sendo 2,15; 2,44 e 2,74 a razão SE/CA para as concentrações de 1, 2 e 3x respectivamente. Esses resultados sugerem que ou o DHICA não é capaz de se deslocar do DNA uma vez que interagiu com este, ou a interferência na atividade enzimática seja por inibição da própria enzima promovida pelo precursor DHICA. O pequeno aumento das razões SE/CA ocorreu devido ao aumento da concentração de DNA não lesionado, que possui grande quantidade de DNA íntegro, na sua forma superenovelada.

Na suspeita de que essa alta concentração de DNA pudesse interferir na ação da enzima, realizou-se também um controle, onde o DNA pré-oxidado pelo RB foi colocado em contato com DNA não lesionado 3x mais concentrado e na *ausência* do DHICA, como mostrado nas duas últimas colunas da Figura 17. Na ausência do precursor, a enzima ainda foi capaz de reconhecer os seus sítios de ligação no DNA lesionado, mesmo havendo grande quantidade de DNA competidor no meio e, a razão SE/CA foi de 1,3 aproximadamente. Cerca de 2 vezes menor do que a razão

observada para essa mesma concentração de DNA, porém na presença do precursor (2,74).

Para verificar se o DHICA poderia ter mesmo maior afinidade pelo DNA lesionado e não se deslocar deste para interagir com o DNA competidor, realizou-se um outro experimento onde alterou-se a ordem de adição dos compostos DHICA e DNA competidor, sendo que o DNA competidor foi adicionado em primeiro lugar ao DNA previamente oxidado e em seguida, adicionou-se o DHICA. As duas incubações foram realizadas também por 5 min, em um *shaker*, à 37 °C, protegido da luz. Este experimento teve o intuito de fazer com que o DHICA pudesse se distribuir igualmente entre os dois DNAs, já que eles estavam simultaneamente presentes no meio.

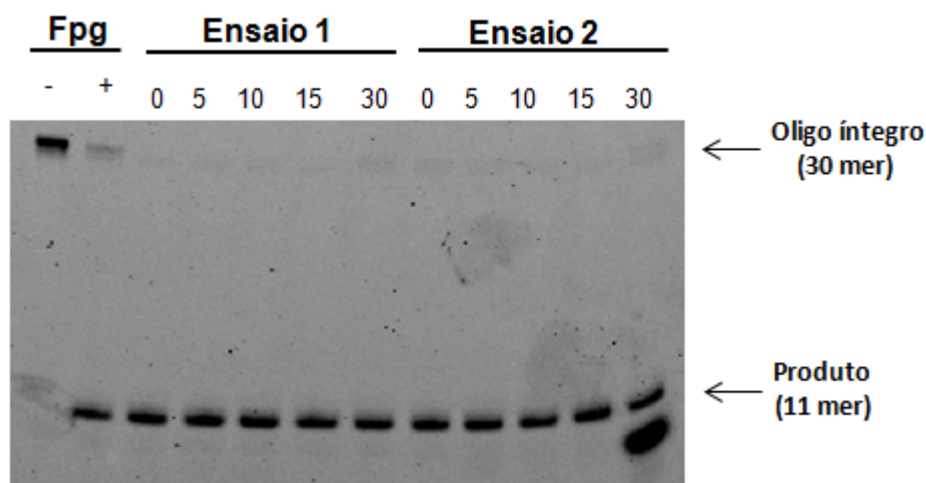
Os resultados mostraram que da mesma maneira, a presença do DHICA impede a clivagem do DNA oxidado pela enzima Fpg, não havendo diminuição da razão SE/CA, mesmo na maior concentração de DNA competidor (3x) (dados não mostrados). Sendo assim, esses resultados levaram à sugestão de que o precursor de melanina, o DHICA, ou interfere diretamente na atividade da enzima Fpg, através de inibição ou reação química com sua estrutura, ou, o DHICA tem preferência por interagir com DNA lesionado (maior concentração de 8-oxoG em sua estrutura) e realiza com este, uma interação com alta força de ligação.

Para responder a essa pergunta, prosseguiram-se os experimentos utilizando oligonucleotídeo. O oligo utilizado possuía em sua estrutura apenas uma lesão do tipo 8-oxoG, facilitando assim a quantificação da atividade da enzima.

## 5.2 ENSAIOS DE INIBIÇÃO

A fim de se obter um melhor resultado com relação à influência do DHICA na atividade da enzima Fpg e esclarecer a dúvida de se o DHICA é um inibidor da enzima em questão, experimentos utilizando oligonucleotídeo de 30 mer contendo em sua estrutura uma lesão do tipo 8-oxoG foram realizados. Para isso, incubou-se a enzima à 0 °C, na presença do precursor em diferentes tempos (0, 5, 10, 15 e 30 min) e em seguida adicionou-se o duplex às amostras e incubou-se o conjunto por mais 60 min, à 37 °C, protegido da luz (Ensaio 1). Realizou-se também a pré-incubação das três espécies simultaneamente, também à 0 °C, nos mesmos tempos e, em seguida, incubou-se as amostras, por 60 min, à 37 °C, protegido da luz

(Ensaio 2). As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, revelado no Typhoon TRIO (GE Healthcare) e, os resultados estão mostrados na Figura 18 a seguir.



**FIGURA 18. INCUBAÇÃO DO OLIGO COM DHICA E FPG**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: *Ensaio 1*: A enzima Fpg (0,1 U) foi pré-incubada com DHICA (1000 fmol) nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 30 min, à 0 °C, protegido da luz. Em seguida, adicionou-se o duplex (100 fmol) às amostras e incubou-se por mais 60 min, à 37 °C, protegido da luz. *Ensaio 2*: A enzima Fpg (0,1 U) foi pré-incubada com DHICA (1000 fmol) e o oligo (100 fmol) nos tempos de 0, 5, 10, 15 e 30 min, à 0 °C, protegido da luz e, na sequência, incubou-se as amostras por 60 min, à 37 °C, protegido da luz. Parou-se as reações através da adição de formamida 50% ao meio. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e o gel foi revelado em um visualizador de fluorescência Typhoon TRIO (GE Healthcare).

Os ensaios foram repetidos 3 vezes cada e, para todas eles o resultado foi o mesmo que o mostrado na Figura 18. O que se observa é que não há inibição da enzima Fpg, já que não houve diminuição da concentração do produto na presença do precursor, para todos os tempos de incubação. Testou-se também, um ensaio com as mesmas condições descritas acima, porém com 2000 fmol de DHICA, mas a falta de inibição também foi verificada.

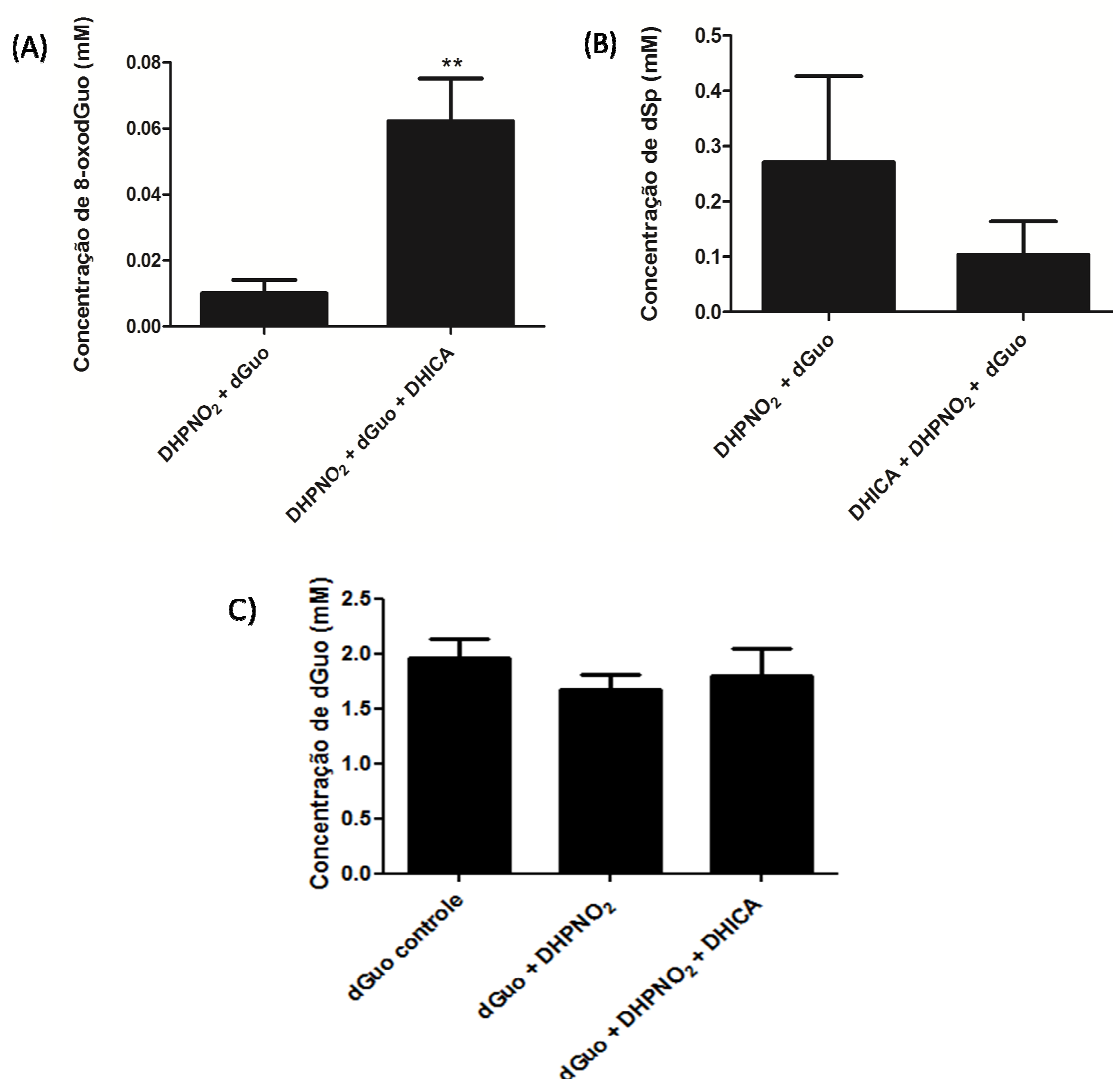
Sendo assim, considerando esses e os resultados mostrados anteriormente, o que se pode constatar é que a diminuição da capacidade de reconhecimento da enzima Fpg aos sítios lesionados, quando na presença do DHICA, não é devido inibição enzimática. Esses dados se aproximam ainda mais da hipótese de que a

diminuição da atividade da enzima seja devido a interação do DHICA com o DNA que bloqueia os sítios de reconhecimento da mesma. O resultado da Figura 13, que mostra que o DHICA diminui a fluorescência do sistema EtBr-DNA, provavelmente por competir com os mesmos sítios de ligação do EtBR, valida esta hipótese. Os ensaios de competição realizados com DNA pré-oxidado, mostrado nas Figuras 16 e 17, após analisar o resultado da Figura 18, sugerem que o DHICA não tem capacidade de deslocamento do DNA oxidado uma vez que interagiu com o mesmo e, por isso não é observada restauração da atividade da enzima.

### **5.3 ENSAIOS COM 2'-DESOXIGUANOSINA**

#### **5.3.1 Efeito do DHICA nos produtos de oxidação da dGuo por $^1\text{O}_2$**

Com a finalidade de avaliar a interferência do DHICA na oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ , a dGuo foi incubada com DHPNO<sub>2</sub> na presença e ausência de DHICA, de acordo com o descrito no item 4.7.1. Os produtos de oxidação foram analisados por HPLC e, quantificados através da utilização de uma curva de calibração do padrão de cada espécie em estudo. Avaliou-se a formação dos principais produtos de oxidação, que são a 8-oxodGuo e a dSp. A influência do DHICA na formação desses dois produtos de oxidação está mostrada na Figura 19 a seguir. Os controles com DHPN também foram realizados e, da mesma maneira, este derivado de naftaleno não influencia nos resultados obtidos para o DHPNO<sub>2</sub>, assim como o DHICA sozinho não foi capaz de formar nenhum dos dois produtos de oxidação.



**FIGURA 19 - INFLUÊNCIA DO DHICA NA FORMAÇÃO DOS PRODUTOS DE OXIDAÇÃO DA dGUO PELO  $^1\text{O}_2$**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: A dGuo (2 mM) foi incubada com o DHPNO<sub>2</sub> (20 mM) na presença e ausência de DHICA (2 mM) em um *shaker*, por 2h30min, à 37 °C, protegido da luz. As amostras foram analisadas por HPLC e quantificadas utilizando-se uma curva de calibração com o padrão de cada espécie avaliada. (A) Influência do DHICA na formação de 8-oxodGuo. (B) Influência do DHICA na formação de dSp. Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o Teste-T não pareado. (\*\* para  $P < 0,001$ ). Para a letra B, não houve diferença estatística entre as amostras. (C) Avaliação da concentração final de dGuo após a incubação— **controle**: dGuo sem adição de DHPNO<sub>2</sub> e DHICA; **dGuo + DHPNO<sub>2</sub>**: dGuo incubada com DHPNO<sub>2</sub>; **dGuo + DHPNO<sub>2</sub> + DHICA**: dGuo incubada com DHPNO<sub>2</sub> na presença de DHICA. Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de Tukey como *post-hoc*. Porém não foi encontrada diferença estatística entre as amostras.

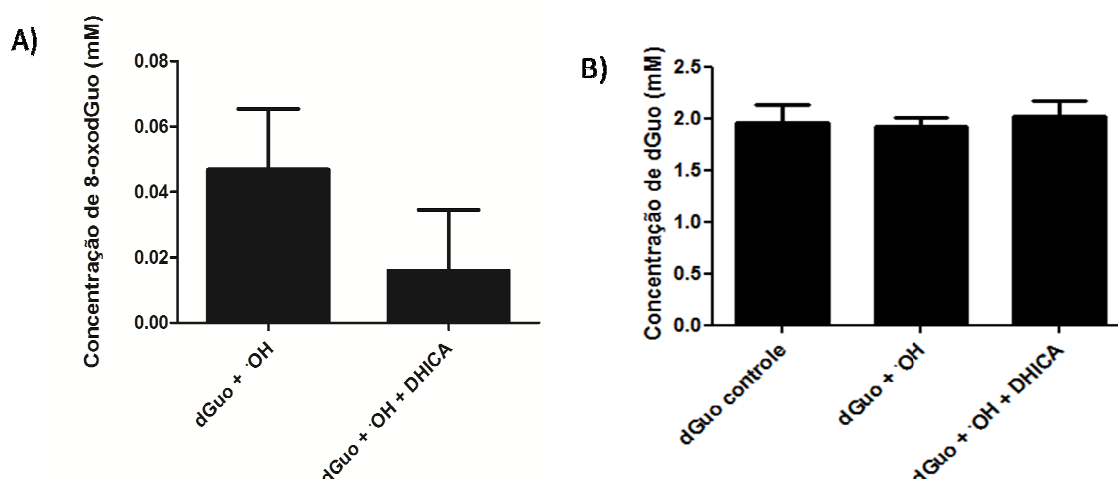
Através da Figura 19 (A) é possível observar que quando na presença do DHICA, a concentração de 8-oxodGuo formada foi bem maior do que na ausência, aproximadamente 4 vezes. Já na letra B da mesma figura, o resultado foi o inverso, a formação de dSp na presença do precursor houve uma tendência a ser cerca de 3 vezes menor, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre as amostras.

Levando em consideração a via de oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ , mostrada na Figura 2, verifica-se que a dSp pode ser formada através de duas maneiras. Diretamente pela oxidação da dGuo ou, pela re-oxidação da 8-oxodGuo. Dessa maneira, analisando-se os resultados obtidos, acredita-se que o DHICA esteja impedindo a re-oxidação da 8-oxodGuo à dSp e por isso ocorre acúmulo desta espécie na presença do precursor. O que corrobora com o resultado da letra B, que mostra que a formação de dSp é menor na presença deste composto e, nesse caso, a pequena quantidade de dSp formada se deve à oxidação direta da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ .

A letra C, da figura em questão mostra o consumo de dGuo frente incubação com as espécies DHPNO<sub>2</sub> e DHICA separada e simultaneamente. Pôde-se perceber uma leve diminuição da concentração final de dGuo após incubação com DHPNO<sub>2</sub> e, essa diminuição não foi observada para dGuo incubada com DHPNO<sub>2</sub> na presença do precursor. Esse dado sugere que o DHICA tende a proteger a oxidação da dGuo pelo DHPNO<sub>2</sub>.

### 5.3.2 Efeito do DHICA nos produtos de oxidação da dGuo por $\bullet\text{OH}$

Da mesma maneira que no item 5.3.1, buscou-se avaliar a capacidade do DHICA de interferir nos produtos de oxidação da dGuo pelo  $\bullet\text{OH}$ . Para isso, a dGuo foi incubada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e  $\bullet\text{OH}$ , com e sem DHICA, como descrito no item 4.7.1. Os produtos de oxidação foram analisados por HPLC e, quantificados através da utilização de uma curva de calibração do padrão da espécie em estudo. Avaliou-se a formação de 8-oxodGuo e a influência do precursor sobre a formação da mesma. O resultado está mostrado na Figura 20. O DHICA e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sozinhos não foram capazes de formar este produto de oxidação.



**FIGURA 20 - INFLUÊNCIA DO DHICA NA FORMAÇÃO DE 8-OXODGUO PELO •OH**

FONTE: O autor (2013).

NOTA: A dGuo (2 mM) foi incubada com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12 mM) e  $\text{FeCl}_2$  (3,75 mM) – sistema gerador de  $\bullet\text{OH}$  – na presença e ausência de DHICA (2 mM) em um *shaker*, por 2,5 h, à 37 °C, protegido da luz. As amostras foram analisadas por HPLC e quantificadas utilizando-se uma curva de calibração com o padrão de cada espécie avaliada. (A) Influência do DHICA na formação de 8-oxodGuo. Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o Teste-T não pareado. Porém não foi evidenciada diferença estatística entre as amostras. (B) Concentração final de dGuo após incubação – **controle**: dGuo sem adição de nenhuma espécie; **dGuo + •OH**: dGuo incubada com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{FeCl}_2$ ; **dGuo + •OH + DHICA**: dGuo incubada com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{FeCl}_2$  na presença de DHICA. Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes. Utilizou-se para análise estatística o teste ANOVA seguido de Tukey como *post-hoc*. Porém não foi encontrada diferença estatística entre as amostras.

A Figura 20 mostra que a presença do DHICA interfere negativamente na formação de 8-oxodGuo pelo  $\bullet\text{OH}$ . É visivelmente claro que a formação desta espécie na presença de DHICA é menor, apesar da falta de diferença estatística entre as amostras. A concentração de 8-oxodGuo formada na *ausência* do precursor foi aproximadamente 1,5 vezes maior do que na *presença*.

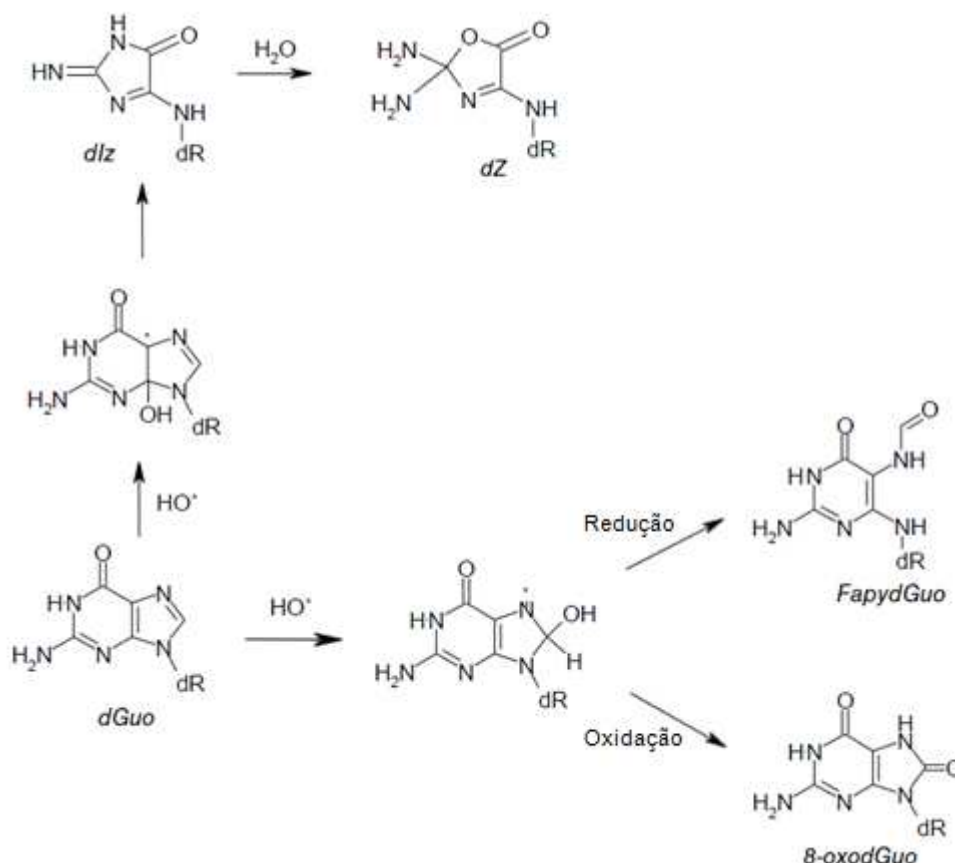
Uma hipótese sugerida é que o DHICA reaja com o ferro, impedindo a reação de Fenton. Novellino e colaboradores em 1999, constataram que, na presença de DHICA (0,1 a 2,0 mM), a degradação da dGuo (3 mM) pela reação de Fenton, foi significativamente menor, porém os autores não se preocuparam em avaliar os produtos de oxidação da dGuo. A letra B da Figura 20 de fato mostra uma leve

diminuição da concentração final de dGuo na *ausência* no precursor. Enquanto na *presença* deste, a concentração final de dGuo foi ligeiramente maior. No entanto, no presente trabalho a diferença de concentração final de dGuo entre as amostras não foi considerada significativa.

Ainda no trabalho citado, os autores também acompanharam a formação de complexos de DHICA com Fe(II) espectrofotometricamente. Foi observado que o conjunto DHICA-Fe apresentou um pico de absorção em 560 nm (o que não é observado para o monômero sozinho, o qual exibe máxima absorção na região UV do espectro eletromagnético). Ainda nesse trabalho, avaliou-se também, o consumo de DHICA por HPLC no curso da reação de Fenton com dGuo e, verificou-se que a concentração do mesmo diminuía de forma tempo-dependente.

O  $\bullet\text{OH}$  pode também formar outros produtos de oxidação com a dGuo, tais como oxazolona e imidazolona, que se formam através de um outro intermediário, o guanil radical (Figura 21). Em reações em que o  $\bullet\text{OH}$  é formado na ausência de ferro, como por exemplo, radiação gama, são esses os produtos de oxidação predominantes e, a formação de 8-oxodGuo é bem menor (RAVANAT *et al.*, 2003). Porém, o ferro presente no meio devido a reação de Fenton, reduz o guanil radical e esses produtos não chegam a ser formados (CADET *et al.*, 2012). Segundo Frelon e colaboradores (2002), o principal produto de oxidação da dGuo por  $\bullet\text{OH}$  gerado através da reação de Fenton, é a Fapy-dG, devido a presença de espécies ainda não identificadas que exibem propriedades redutoras. Sendo assim, uma outra hipótese lançada neste trabalho, é que o DHICA exibe tal propriedade redutora, modulando a reação para a formação de Fapy-dG, fazendo com que esse produto seja formado ainda em maior quantidade na presença do precursor e, por isso a concentração de 8-oxodGuo neste caso é menor. Todavia, o tempo de vida da Fapy-dG é muito curto em solução e, essa falta de estabilidade inviabiliza sua detecção pelos métodos utilizados neste trabalho, sendo tal hipótese incapaz de ser consolidada até o momento.





**FIGURA 21 - PRODUTOS DE OXIDAÇÃO GERADOS ATRAVÉS DA REAÇÃO DA GUANINA COM  $\text{HO}^\bullet$**

FONTE: Adaptada de Cadet e colaboradores (2003).

NOTA: A dGuo pode sofrer oxidação pelo  $\text{HO}^\bullet$  e formar dois intermediários radicais diferentes, o guanil radical (acima) e o 8-hidroxi-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosil radical (à direita). O guanil radical gera imidazolona (dlz), e esta pode sofrer hidratação e formar oxazolona (dZ). O -hidroxi-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosil radical, em condições redutoras gera o produto Fapy-dG e em condições oxidantes, pode gerar o produto 8-oxodGuo.

## 6. DISCUSSÃO

Nas três últimas décadas, verificou-se um grande aumento no número de trabalhos que tratavam do efeito danoso da melanina e seus precursores. Como evidenciado por Routaboul e colaboradores em 1995 e mais tarde, em 1999 por Kipp e Young, o precursor de eumelanina DHICA, é capaz de provocar danos ao DNA, tanto na sua forma plasmidial quanto em DNA de células humanas. Muitos outros trabalhos também mostraram que a eumelanina e a feomelanina também possuem características deletérias aos organismos vivos (HILL e HILL, 1987, KORYTOWSKI *et al.*, 1987, SARNA *et al.*, 1980). Na maioria desses trabalhos os autores utilizaram radiação ultra-violeta (UVA e UVB) para induzir dano ao material genético e avaliar o comportamento dessas espécies frente à essa irradiação. A utilização de radiação tem justamente o intuito de mimetizar a radiação provocada pela exposição à luz solar, visto que é devida a esta exposição que ocorre a maior incidência de câncer de pele, sendo o do tipo melanoma, o mais grave, apresentando cerca de 80% do total de mortes relacionadas a esse tipo de tumor (MENDES *et al.*, 2010).

No desenvolvimento do melanoma, há perda da integridade dos melanossomos, organelas responsáveis pela síntese do pigmento (RHODES *et al.*, 1988; BOROVANSKY *et al.*, 1991). Sendo assim, é possível que haja o escape de melanina e seus precursores (JIMBOW *et al.*, 1993; KIPP e YOUNG, 1999), tornando-os passíveis de reagir com os outros constituintes celulares, inclusive o DNA. Recentemente, no nosso grupo de pesquisa, verificou-se que a ação das melaninas ao DNA está relacionada com a proximidade destas moléculas, visto que este pigmento tem capacidade de se ligar aos sulcos menores do DNA (SUZUKAWA *et al.*, 2012).

No presente estudo, foi evidenciado que o DHICA sozinho é capaz de induzir quebra em DNA plasmidial. Diferentemente dos outros trabalhos, não foi utilizada irradiação. Ao invés disso, optou-se por gerar  $^1\text{O}_2$ , visto que é a principal espécie reativa gerada na presença de radiação UVA (BAIER *et al.*, 2007; CADET *et al.*, 2003). Verifica-se também, perda da capacidade de dano quando o precursor é pré-oxidado pelo  $^1\text{O}_2$ , fato que está em concordância com Suzukawa e colaboradores (2012), que observaram a mesma perda da capacidade danosa, após incubação da própria eumelanina com  $^1\text{O}_2$ . Os autores sugeriram que a eumelanina tenha propriedades de *scavenger* de  $^1\text{O}_2$ . De fato, já havia sido sugerido que o  $^1\text{O}_2$  poderia

se ligar ao anel indólico da eumelanina (CHIARELLI-NETO, PAVANI *et al.*, 2011). Como o próprio DHICA possui esse anel indólico, é possível que ele sozinho seja capaz de sequestrar  $^1\text{O}_2$ . Este resultado é muito importante, pois como já discutido, a principal espécie gerada através de radiação UVA é o  $^1\text{O}_2$ . Dessa maneira, a medida que o DHICA pode induzir quebra ao material genético, ele pode também evitar sua oxidação pelo  $^1\text{O}_2$ . Considerando que o DHICA provavelmente só atinja o material genético frente a algum estresse celular, como por exemplo radiação solar, e que através dessa radiação ele perde sua capacidade nociva (geração de  $^1\text{O}_2$ ), nos deparamos com um caráter protetor do precursor frente a uma fonte de oxidação do DNA, que age como *scavenger* de  $^1\text{O}_2$ .

Com esses estudos foi possível também explorar um novo papel do precursor de melanina no contexto celular. Foi observada diminuição de reconhecimento da enzima Fpg aos sítios lesionados do DNA quando na presença do DHICA. Acredita-se que esse efeito seja devido a interação do precursor com o DNA, impedindo o alcance da enzima aos sítios lesionados. Considerando que a própria eumelanina tem a capacidade de interagir com o DNA e também diminuir o reconhecimento da enzima Fpg (SUZUKAWA *et al.*, 2012) é possível que o DHICA intercale o DNA, já que tem tamanho menor, ao invés de simplesmente se ligar aos seus sulcos menores.

Realizando ensaios com DNA competidor, com a intenção de deslocar o DHICA de onde estaria impedindo o alcance da enzima, verificou-se que o baixo reconhecimento se mantém mesmo em grande excesso de concentração do DNA competidor (3x mais concentrado). Com isso duas hipóteses importantes foram formuladas, a primeira é que o precursor não tem a capacidade de se deslocar de onde interagiu com o DNA, através de uma ligação muito forte entre os dois e, a segunda hipótese seria que o DHICA tem a propriedade de inibir a enzima Fpg, tornando-a parcialmente inativa. Para responder essa pergunta com maior precisão, utilizou-se oligonucleotídeo contendo em sua estrutura uma lesão do tipo 8-oxoG. Pelos resultados obtidos, acredita-se que não haja inibição enzimática, uma vez que não houve diferença na quebra no oligo pela enzima Fpg quando na presença do DHICA. Como o oligo é pequeno, então é possível que o DHICA não consiga intercalá-lo e por isso não tem a mesma ação observada no DNA plasmidial.

Problemas na capacidade de reparo do DNA podem levar a uma instabilidade genética e consequentemente o aparecimento de doenças neurodegenerativas ou

até mesmo o câncer (McNEILL *et al.*, 2004). Em mamíferos, na via de reparo por excisão de base, a enzima responsável pela excisão da lesão do tipo 8-oxoG em guaninas, é a enzima OGG1. Em estudos realizados com camundongos, verificou-se que a ausência desta enzima resulta no acúmulo de 8-oxoG e consequente mutação de um par G-C para um par T-A (BRAVARD *et al.*, 2010). Embora a Fpg seja uma enzima encontrada apenas em bactérias do tipo *E. coli*, os resultados obtidos neste trabalho dão o primeiro passo e abrem caminho para se descobrir um novo papel da eumelanina e seus precursores no ambiente celular, visto que esta propriedade dos mesmos era até pouco tempo, desconhecida. Para consolidar a hipótese de que o DHICA possa perturbar de alguma maneira o sistema de reparo do DNA, um próximo passo poderia ser realizar os estudos com enzimas responsáveis pelo reparo do DNA de células animais, como OGG1 e MYH.

Explorando ainda mais o papel do precursor com relação ao DNA, observou-se em ensaios utilizando HPLC, que o mesmo interfere na formação dos produtos de oxidação do DNA pelo  $^1\text{O}_2$  e  $\bullet\text{OH}$ .

O  $^1\text{O}_2$  pode gerar dois produtos de oxidação através da dGuo, a 8-oxodGuo e a dSp. Os dois produtos podem ser formados diretamente através da oxidação da dGuo. Porém a 8-oxodGuo pode sofrer re-oxidação pelo  $^1\text{O}_2$  e gerar dSp (MARTINEZ *et al.*, 2002). O que se observou nos resultados obtidos com a incubação da dGuo com DHICA e DHPNO<sub>2</sub>, foi que na presença do DHICA, a formação de 8-oxodGuo foi maior do que na sua ausência e, em contrapartida, a formação de dSp foi menor. Isso sugere que o DHICA poderia estar de alguma forma impedindo a oxidação secundária da 8-oxodGuo à dSp e, a dSp formada neste caso, é devido apenas à oxidação direta da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ . O acúmulo de 8-oxodGuo teria um efeito maléfico no ambiente celular, pois a formação de 8-oxodGTP no *pool* de nucleotídeos pode ser genotóxica, uma vez que este produto pode ser inserido pela DNA polimerase e provocar uma transversão do tipo G → T e, não se sabe até o momento, se a dSp também pode ser reconhecida pela DNA polimerase.

Com relação à oxidação da dGuo pelo  $\bullet\text{OH}$  na presença do precursor, o resultado foi inverso ao observado pelo  $^1\text{O}_2$ , sendo a concentração de 8-oxodGuo, neste caso, menor do que na ausência do precursor. Sendo assim, existem duas hipóteses lançadas a respeito deste resultado, a primeira é que o DHICA seja capaz

de interagir com o ferro, diminuindo parte da reação de Fenton e, a segunda é que o DHICA tenha propriedades redutoras e torne a concentração de Fapy-dG maior. Considerando a segunda hipótese, como as duas principais espécies formadas pelo  $\bullet\text{OH}$  por reação de Fenton são 8-oxodGuo e Fapy-dG e ambas as espécies possuem caráter mutagênico e genotóxico, a suspeita de que o DHICA desloque o equilíbrio da reação para formação de Fapy-dG, não influencia na avaliação de certo caráter protetor ou agravador do mesmo. Ainda não está descrito na literatura se entre a 8-oxodGuo e a Fapy-dG, há uma mais mutagênica do que a outra.

Porém, se levarmos em consideração a primeira hipótese, esses resultados apontam para uma característica benéfica do precursor, uma vez que a reação de Fenton é a principal fonte de  $\bullet\text{OH}$  nos sistemas biológicos e, este radical por sua vez é a espécie mais reativa dentre as principais ROS conhecidas até o momento. Este radical é capaz de reagir com a maioria das biomoléculas. Se o intermediário melanogênico possui de fato caráter inibidor da geração desta espécie, esse dado é de extrema relevância no ambiente celular. Extrapolando os resultados, podemos acreditar que o DHICA possa prevenir a oxidação das bases do DNA pelo  $\bullet\text{OH}$ , o que poderá diminuir a ocorrência de mutações do material genético.

Sendo assim, a contradição dos efeitos favoráveis e desfavoráveis do DHICA aos sistemas biológicos permanece. A medida que o precursor é capaz de provocar danos ao DNA, causando quebra de fita simples e, perturbar a via de reparo pela enzima Fpg, o mesmo pode também contribuir na prevenção da oxidação das bases do DNA, agindo como *scavenger* de  $^1\text{O}_2$  e ainda, pode diminuir os efeitos da reação de Fenton, geradora de  $\bullet\text{OH}$ , tão nocivo a todos organismos vivos. Com isso, é possível considerar que o fato do DHICA atrapalhar o sistema de reparo de lesões oxidativas, pode não ser tão deletério, uma vez que na presença do precursor o DNA provavelmente não se encontrará tão oxidado. Esses resultados são de extrema relevância biológica e, abrem caminho a uma gama de descobertas a respeito do papel da eumelanina e seus precursores no organismo humano.

## 7. CONCLUSÕES

Em relação ao dano ao DNA, foi constatado que este precursor tem habilidade de danificar o material genético aumentando o número de quebra de fita simples. Porém, esta capacidade de dano é perdida quando o precursor é pré-oxidado pelo  $^1\text{O}_2$ , provavelmente por agir como *scavenger* desta espécie.

Outro dado importante extraído deste trabalho é a capacidade que o DHICA tem de interagir com o DNA e dificultar a ação da enzima de reparo, a Fpg. O que se pôde constatar é que essa diminuição não é devida a inibição enzimática e que provavelmente isso acontece devido intercalação do DNA pelo DHICA, o que impede o alcance da enzima aos sítios lesionados. Pôde-se observar ainda, que essa ligação do DHICA com o DNA é provavelmente muito forte.

Além da capacidade de dano ao DNA direta e indiretamente, foi verificado que o DHICA também é capaz de influenciar na formação dos produtos de oxidação da dGuo pelo  $^1\text{O}_2$  e  $\bullet\text{OH}$ . Com relação aos efeitos do precursor frente a oxidação do dGuo pelo  $^1\text{O}_2$ , o precursor pode impedir a re-oxidação da 8-oxodGuo à dSp. Já com relação ao  $\bullet\text{OH}$ , quando este é gerado através da reação de Fenton, o DHICA possivelmente pode evitar ao menos parcialmente sua formação e consequentemente diminuir a oxidação da dGuo, provavelmente por reagir com o Fe(II) formando um complexo, como já mostrado em trabalhos anteriores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, G. R., HENDERSON, J. R., CHANG, S., -C., McNEIL, C. J., BIRCH-MACHIN, M. A. Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Experimental Dermatology*, v. 32, p. 722-727, 2007.

ALTIERI, F., GRILLO, C., MACERONI, M., CHICHIARELLI, S. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 10, n. 5, p. 891-937, 2008.

BAIER, J., MAISCH, T., MAIER, M., LANDTHALER, M., BÄUMLER, W. Direct detection of singlet oxygen generated by UVA radiation in human cells and skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, p. 1498-1506, 2007.

BAUTE, J., DEPICKER, A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v.43, p. 239–276, 2008.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, p. 1620-1624, 1990.

BERRA, C.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p.1340-1344, 2006.

BOITEUX, S., GAJEWSKI, E., LAVAL, J. and DIZDAROGLU, M. Substrate specificity of the Escherichia coli Fpg protein formamidopyrimidine-DNA glycosylase: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, v. 31, n. 1, p. 106-110, 1992.

BOROVANSKY, J., MIREJOVSKY, P., RILEY, P. A. Possible relationship between abnormal melanosome structure and cytotoxic phenomena in malignant melanoma. *Neoplasma*, v. 38, n. 4, p. 393-400, 1991.

BRAVARD, A., CAMPALANS, A., VACHER, M., GOUGET, B., LEVALLOIS, C., CHEVILLARD, S., RADICELLA, J. P. Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium. *Mutation Research*, v. 685, p. 61-69, 2010.

CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J-P.; RAVANAT, J-L.; SAUVAIGO, S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research*, v. 424, n. 1-2, p. 9-21, 1999.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J.-L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research*, v. 531, p. 5-23, 2003.

CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; RAVANAT, J.-L.; WAGNER, J. R. Oxidatively Generated Nucleobase Modifications in Isolated and Cellular DNA. *Encyclopedia of Radicals in Chemistry, Biology and Materials*, p. 1-26, 2012.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.-L. Oxidatively Generated Damage to the Guanine Moiety of DNA: Mechanistic Aspects and Formation in Cells. *Accounts of Chemical Research*, v. 41, n. 18, p. 1075-1083, 2008.

CADET, J.; RAVANAT, J.-L.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Singlet Oxygen Oxidation of Isolated and Cellular DNA: Product Formation and Mechanistic Insights. *Photochemistry and Photobiology*, v. 82, n. 5, p. 1219-1225, 2006.

CHARKOUDIAN, L. K., FRANZ, K. J. Fe(III)-coordination properties of neuromelanin components: 5,6-dihydroxyindole and 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid. *Inorganic Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 3657-64, 2006.

CHIARELLI-NETO, O.; PAVANI, C.; FERREIRA, A. S.; UCHOA, A. F.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M. S. Generation and suppression of singlet oxygen in hair by photosensitization of melanin. *Free Radicals Biology and Medicine*, v. 51, n. 6, p. 1995-1202, 2011.

COLE, J.; SKOPEK, T. R. international commission for protection against environmental mutagens and carcinogens. Working paper no. 3. somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutation Research*, v. 304, n. 1, p. 33-105.

COSTE, F.; OBER, M.; CARELL, T.; BOITEUX, S.; ZELWER, C.; CASTAING, B. Structural Basis for the Recognition of the FapydG Lesion (2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 42, p. 44074-44083, 2004.

DAVID, S. S.; O'SHEA, V. L.; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, v. 447, n. 21, p. 941-950, 2007.

DELANEY, M. O.; WIEDERHOLT, C. J.; GREENBERG, M. M. Fapy•dA Induces Nucleotide Misincorporation Translesionally by a DNA Polymerase. *Angewandte Chemie International Edition*, v.41, p.771–773, 2002.

EBLIN, K. E., BOWEN, M. E., CROMEY, D. W., BREDFELDT, T. G., MASH, E. A., LAU, S. S. e GEOLFI, A. J. Arsenite e monomethylarsonous acid generate oxidative stress response in human bladder cell culture. *Toxicology e Applied Pharmacology*, v. 217, n. 1, p. 7-14, 2006.

FELIX, C. C.; HYDE, J. S.; SARNA, T.; SEALY, R. C. Melanin photoreactions in aerated media: Electron spin resonance evidence for production of superoxide and hydrogen peroxide. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v. 84, p. 335-341, 1978.



FRELON, S.; DOUKI, T.; FAVIER, A.; CADET, J. Comparative study of base damage induced by gamma radiation and fenton reaction in isolated DNA. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, p. 2866-70, 2002.

FRIEDBERG, E. C. DNA damage and repair. *Nature*, v. 421, p. 436-440, 2003.  
FROSINA, G., FORTINI, P., ROSSI, O., CARROZZINO, F., RASPAGLIO, G., COX, L.S., LANE, D.P., ABBONDANDOLO, A., DOGLIOTTI, E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, p. 9573–9578, 1996.

GAJEWSKI, E.; RAO, G.; NACKERDIEN, Z.; DIZDAROGLU, M. Modification of DNA Bases in Mammalian Chromatin by Radiation-Generated Free Radicals. *Biochemistry*, v. 29, p. 7876–7882, 1990.

GAUDEN, M., PEZELLA, A., PANZELLA, L., NEVES-PETERSEN, M. T., SKOVSEN, E., PETERSEN, S. B., MULLEN, K. M., NAPOLITANO, A., d'ISCHIA, M., SUNDSTRÖM, V. Role of Solvent, pH, and Molecular Size in Excited-State Deactivation of Key Eumelanin Building Blocks: Implications for Melanin Pigment Photostability. *JACS*, v. 130, p. 17038-43, 2008.

GREENBERG, M. M. The Formamidopyrimidines: Purine lesions formed in competition with 8-oxopurines from oxidative stress. *Accounts of Chemical Research*, v. 45, n. 4, p. 588-597, 2012.

HAMPTON, M. B.; ORRENIUS, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letters*, v. 414, p. 552-556, 1997.

HANSSON, C. Demonstration of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, a melanin precursor, in normal urine. *Acta Dermatovenereol.*, v. 63, p. 147-149, 1983.

HEARING, V. J., TSUKAMOTO, K. Enzymatic control of pigmentation in mammals. *The FASEB Journal*, v. 5, p. 2902-09, 1991.

HEGDE, M.L., HAZRA, T.K., MITRA, S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*, v.18 p.27–47, 2008.

HENDERSON, P. T., DELANEY, J. C., MULLER, J. G., NEELEY, W. L., TANNENBAUM, S. R., BURROWS, C. J., ESSIGMANN, J. M. The Hydantoin Lesions Formed from Oxidation of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine Are Potent Sources of Replication Errors in Vivo. *Biochemistry*, v. 42, p. 9257-9262, 2003.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K. B. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. New Jersey: Wiley-Liss, 2004. p. 319-368.

HERRERA-MELIÁN, J. A.; RENDÓN, E. T.; RODRÍGUEZ, J. M. D.; SUÁREZ, A. V.; CAMPO, C. V. DO; PEÑA, J. P.; MESA, J. A. Incidence of pretreatment by potassium

permanganate on hazardous laboratory wastes photodegradability. *Water Research*, v. 34, n. 16, p. 3967-3976, 2000.

HILL, H. Z.; HILL, G. J. Eumelanin causes DNA strand breaks and kills cells. *Pigment Cell Research*, v. 1, p. 163-170, 1987.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutation Research*, v. 428, p. 23-32, 1999.

IMLAY, J. A.; LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, v. 240, n. 4857, p. 1302-1309, 1988.

ISHIIL, T.; MIYAZAWAL, M.; HARTMAN, P. S.; ISHIIL, N. Mitochondrial superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) inducible “*mev-1*” animal models for aging research. *BMB reports*, v. 44, n. 5, p. 298-305, 2011.

ITO, S. A Chemist's View of Melanogenesis. *Pigment Cell Research*, v. 16, p. 230-236, 2003.

JIMBOW, K., LEE, S. K., KING, M. G., HARA, H., CHEN, H., DAKOUR, J., MARUSYK, H. Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 100, n. 3, p. 259S-268S, 1993.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, v. 295, p. 849-868, 2008.

JUNG, H., GUO, B., ANASTASIO, C., KENNEDY, I. M. Quantitative measurements of the generation of hydroxyl radicals by soot particles in a surrogate lung fluid. *Atmospheric Environment*, v.40, n. 6, p. 1043-52, 2006.

KANNO, T. NAKAMURA, K., IKAI, H., KIKUCHI, K., SASAKI, K., NIWANO, Y. Literature review of the role of hydroxyl radicals in chemically induced mutagenicity and carcinogenicity for the risk assessment of a disinfection system utilizing photolysis of hydrogen peroxide. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, v. 51, n. 1, p. 9-14, 2012.

KIPP, C.; YOUNG, A. R. The soluble eumelanin precursor 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid enhances oxidative damage in human keratinocyte DNA after UVA irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, v. 70, n. 2, p. 191-198, 1999.

KOBAYASHI, N.; NAKAGAWA, A.; MURAMATSU, T.; YAMASHINA, Y.; SHIRAI, T.; HASHIMOTO, M. W.; ISHIGAKI, Y.; OHNISHI, T.; MORI, T. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced dna photoproducts in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 110, p. 806-810, 1998.

KOCH, W. H.; CHEDEKEL, M. R. Photogeneration of free radicals from eumelanogenic intermediates and metabolites. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 924, p. 458-466, 1987.

KORYTOWSKI, W.; PILAS, B.; SARNA, T.; KALYANARAMAN, B. Photoinduced generated of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in melanins. *Photochemistry and Photobiology*, v. 45, n. 2, p. 185-190, 1987.

KOVACS, D., FLORI, E., MARESCA, V., OTTAVIANI, M., ASPITE, N., DELL' ANNA, M. L., PANZELLA, L., NAPOLITANO, A., PICARDO, M., d'ISCHIA, M. The eumelanin Intermediate 5,6-Dihydroxyindole- 2-Carboxylic Acid Is a Messenger in the Cross-talk among Epidermal Cells. *Nature*, v. 132, p. 1196-1205, 2012.

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, v. 711, n. 1-2, p. 193-201, 2011.

KUSHWAHA, S., VIKRAM, A., TRIVEDI, P.P., JENA, G. B. Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research*, v. 726, p. 242-250, 2011.

LEPECQ, J. -B.; PAOLETTI, C. A Fluorescent Complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids Physical-Chemical Characterization. *Journal of Molecular Biology*, v. 27, p. 87-106, 1967.

LI, N.; WANG, H.; XUE, M.; CHANG, C.; CHEN, Z.; ZHUO, L.; TANG, B. A highly selective and sensitive nanoprobe for detection and imaging of the superoxide radical and living cells. *Chemical Communications*, 2012.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, v. 362, p. 709-715, 1993.

MAEDA, K., HATAO, M. Involvement of Photooxidation of Melanogenic Precursors in Prolonged Pigmentation Induced by Ultraviolet A. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 122, p. 503-509, 2004.

MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; Di MASCIO, P. Utilização de endoperóxidos de derivados de naftaleno como fontes químicas de oxigênio singlete em sistemas biológicos. *Química Nova*, v. 23, n. 5, p. 686-689, 1999.

MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H. G., RAVANAT, J. L., CADET, J. e MASCIO, P. D. [18O]-Labeled Singlet Oxygen as a Tool for Mechanistic Studies of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine Oxidative Damage: Detection of Spiroiminodihydantoin, Imidazolone e Oxazolone Derivatives. *Biological Chemistry*, v. 383, n.3-4, p. 607-617, 2002.

MARTINEZ, G. R.; RAVANAT, J-L.; CADET, J.; MEDEIROS, M. H. G.; DI MASCIO, P. Spiroiminodihydantoin nucleoside formation from 2'-deoxyguanosine oxidation by [18O-labeled] singlet molecular oxygen in aqueous solution. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 42, n. 10, p. 1326-1332, 2007.

MARTINEZ, J. L.; RAVANAT, J.-L.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J.; DI MASCIO, P. Synthesis of a naphthalene endoperoxide as a source of  $^{18}\text{O}$ -labeled singlet oxygen for mechanistic studies. *Journal of American Chemical Society*, v. 122, p. 1021-1022, 2000.

MAYNARD, S., SCHURMAN, S. H., HARBOE, C., SOUZA-PINTO, N. C., BOHR, V. A. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, v.30, p. 2–10, 2009.

McNEILL, D. R.; NARAYANA, A.; WONG, H. K.; WILSON III, D. M. Inhibition of Ape1 Nuclease Activity by Lead, Iron, and Cadmium. *Environmental Health Perspectives*, v. 112, n. 7, p. 799-804, 2004.

MENDES, G. L., KOIFMAN, R. J., KOIFMAN, S. Mortality frequency and trends attributed to melanoma in Brazil from 1980-2005. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, v. 73, n. 13-14, p. 850-7, 2010.

NILES, J. C., WISHNOK, J. S. e TANNENBAUM, S. R. Spiroiminodihydantoin Is the Major Product of the 8-Oxo-7,8-dihydroguanosine Reaction with Peroxynitrite in the Presence of Thiols e Guanosine Photooxidation by Methylene Blue. *Organic Letters* v.3, n.7, p. 963-966, 2001.

NOVELLINO, L., NAPOLITANO, A., PROTA, G. 5,6-Dihydroxyindoles in the Fenton Reaction: A Model Study of the Role of Melanin Precursors in Oxidative Stress and Hyperpigmentary Processes. *Chemical Research Toxicology*, v. 12, p. 985-992, 1999.

PERES, P. S. da. Efeito da glutatona na oxidação da 2'-desoxiguanosina pelo oxigênio molecular singlete. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PETERSON C.L., COTE J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes, Dev.* 18, p. 602–616, 2004.

PFEIFER, G. P., DENISSENKO, M. F., OLIVIER, M., TRETYAKOVA, N., HECHT, S. S., HAINAUT, P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*, v. 21, p. 7435-51, 2002.

PIERLOT, C., AUBRY, J.-M., BRIVIBA, K., SIES, H., DI MASCIO, P.; LESTER PACKER, H. S. [1] Naphthalene endoperoxides as generators of singlet oxygen in biological media. *Methods in Enzimology*, v. 319, p. 3-20, 2000.

PROTA, G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *The Journal of Investigative Dermatology*, v. 75, p. 122-127, 1980.

RAVANAT, J.-L. e CADET, J. Reaction of Singlet Oxygen with 2'-Deoxyguanosine e DNA. Isolation e Characterization of the Main Oxidation Products. *Chemical Research in Toxicology* v.8, n.3, p. 379-388, 1995.

RAVANAT, J.-L., MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H. G., DI MASCIO, P. e E CADET, J. Mechanistic aspects of the oxidation of DNA constituents mediated by singlet molecular oxygen. *Archives of Biochemistry e Biophysics* v. 426, p. 23-30, 2004.

RAVANAT, J.-L., SAINT-PIERRE, C., CADET, J. One-Electron Oxidation of the Guanine Moiety of 2'-Deoxyguanosine: Influence of 8-Oxo-7,8-dihydro-2-eoxyguanosine. *JACS*, v. 125, p. 2030-31, 2003.

RAVANAT, J.-L.; SAINT-PIERRE, C.; Di MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R.; MEDEIROS, M. H. G.; CADET, J. Damage to Isolated DNA Mediated by Singlet Oxygen. *Helvetica Chimica Acta*, v. 84, p. 3702-09, 2001.

RHODES, A. R., SEKI, Y., FITZPATRICK, T. B., STERN, R. S. Melanosomal alterations in dysplastic melanocytic nevi. A quantitative, ultrastructural investigation. *Cancer*, v. 61, n. 2, p. 358-69, 1988.

ROSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; Di MASCIO, P. MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 563-568, 2006.

ROUTABOUL, C.; SERPENTINI, C. L.; MSIKA, P.; CESARINI, J.P.; PAILLOUS, N. Photosensitization of supercoiled DNA damage by 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, a precursor of eumelanin. *Photochemistry and Photobiology*, v. 62, n. 3, p. 469-475, 1995.

SALOPEK, T. G. *et al.* Dysplastic melanocytic nevi contain high levels of pheomelanin: quantitative comparison of pheomelanin/eumelanin levels between normal skin, common nevi, and dysplastic nevi. *Pigment Cell Res*, v. 4, n. 4, p. 172-9, 1991.

SARNA, T.; DULEBA, A.; KORYTOWSKI, W.; SWARTZ, H. Interaction of melanin with oxygen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 200, p. 140-148, 1980.

SARNA, T.; MENON, I. A.; SEALY, R. C. Photoinduced oxygen consumption in melanin systems – II. Action spectra and quantum yields for pheomelanins. *Photochemistry and Photobiology*, v. 39, p. 805-809, 1984.

SHEU, C., e FOOTE, C. S. Photosensitized oxygenation of a 7,8-dihydro-8-oxoguanosine derivative. Formation of dioxetane e hydroperoxide intermediates. *Journal of American Chemical Society* v.117, p. 474–477, 1995.

SHIMIZU, M., GRUZ, P., KAMIYA, H., MASUTANI, C., XU, Y., USUI, Y., SUGIYAMA, H., HARASHIMA, H., HANAOKA, F. e NOHMI, T. Efficient e erroneous incorporation of oxidized DNA precursors by human DNA polymerase  $\eta$ . *Biochemistry* v. 46, p. 5515-5522, 2007.

STEINBACK, M. J.; KHAN, A. U.; KARNOVSKY, M. Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenylanthracene

and perylene in a polystyrene film. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 21, p. 15649-15654, 1993.

SUZUKAWA, A. A. Papel da feomelanina na formação de lesões oxidativas pelo oxigênio molecular singlete em DNA e em células de melanoma humano. 2012. 203f. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SUZUKAWA, A. A., VIEIRA, A., WINNISCHOFER, S. M. B., SCALFO, A. C., DI MASCIO, P., FERREIRA, A. M. C. da., RAVANAT, J-L., MARTINS, D. L. de., ROCHA, M. E. M., MARTINEZ, G. R. Novel properties of melanins include promotion of DNA strand breaks, impairment of repair, and reduced ability to damage DNA after quenching of singlet oxygen. *Free Radicals Biology and Medicine*, v. 52, p. 1945-1953, 2012.

SUZUKI, T., YAMAMOTO, K., HARASHIMA, H. e KAMIYA, H. Base excision repair system supressess mutagenesis caused by 8-hydroxy-dGTP in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Symposium Series* 51 p. 51-52, 2007.

SVILAR, D.; GOELLNER, E. M.; ALMEIDA, K. H.; SOBOL, R. W. Base Excision Repair and Lesion-Dependent Subpathways for Repair of Oxidative DNA Damage. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 14, n. 12, p. 2491-2507, 2011.

THAYER, M. M.; AHERN, H.; XING, D.; CUNNINGHAM, R. P.; TAINER, J. A. Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *The EMBO Journal*, v. 14, n. 16, p. 4108-4120, 1995.

URABE, K.; AROCA, P.; TSUKAMOTO, K.; MASCAGNA, D.; PALUMBO, A.; PROTA, G.; HEARING, V. J. The inherent cytotoxicity of melanin precursors: a revision. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1221, p. 272-278, 1994.

WILSON, D.M., THOMPSON, L.H. Life without DNA repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, p.12754–12757, 1997.

WIEDERHOLT, C. J.; GREENBERG, M. M. Fapy•dG Instructs Klenow Exo\_ to Misincorporate Deoxyadenosine. *Journal of the American Chemical Society*, v.124, p. 7278–7279, 2002.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nature Chemical Biology*, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

ZHARKOV, D.O. Base excision DNA repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 1544–1565, 2008.